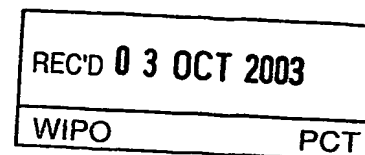


10/525/81
Rec'd PCT/PTO 28 FEB 2005
PCT R 03 / 00120



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes


CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0204160-0 de 30/08/2002.

Rio de Janeiro, 05 de Setembro de 2003.


GLÓRIA REGINA COSTA
Chefe do NUCAD
Mat. 00449119

BEST AVAILABLE COPY

INPI - DEINPI/SP

Protocolo 15303 003889

Número (21)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de
Certificado de Adição



PI0204160-0

depósito

Número e data de depósito

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):
1.1 Nome: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
1.2 Qualificação: EMPRESA BRASILEIRA
1.3 CGC/CPF: 43.828.151/0001-45
1.4 Endereço completo: RUA PIO XI, 1500 - ALTO DA LAPA - 05468-901 - SÃO PAULO - SP
1.5 Telefone: () () () continua em folha anexa
FAX: () ()

2. Natureza:
☒ 2.1 Invenção ☐ 2.1.1. Certificado de Adição ☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza Desejada: PATENTE DE INVENÇÃO
3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):
"COMPOSTO CICLOPALADADO, COMPOSIÇÃO E UNIDADE DE DOSAGEM, SEUS USOS, MÉTODO PARA INIBIR A ATIVIDADE DE PROTEÍNAS E ENZIMAS E MÉTODO DE TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OU DOENÇAS ASSOCIADAS ÀS MESMAS E MÉTODO DE MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO"
() continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do Pedido n.º _____, de ____/____/____

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:
N.º de depósito _____ Data de Depósito _____ (66)

6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

() continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**
() Assinale aqui se o(s) ☒ no(s) requer(em) a não divulgação de seu nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo n.º 127/97)

7.1 Nome:

- (1) Antonio Carlos Fávero Cairés - CPF 063.527.368-31
(2) Claudia Bincoletto Trindade - CPF 062.930.608-73
(3) Ivarne Luis dos Santos Tersariol - CPF 086.410.198-80

7.2 Qualificação: (1) brasileiro, casado, químico / Professor e pesquisador universitário
(2) brasileira, casada, farmacêutica / pesquisadora
(3) brasileiro, casado, Professor e pesquisador universitário

7.3 Endereço:

- (1) Rua Eudóxia Castelo Branco, 371 - apto. 41-A - Vila Suíssa - 08810-040 - Mogi das Cruzes - SP
(2) Rua Vereador Jair Salvarani, 100 - apto. 32 - Vila Oliveira - 08790-020 - Mogi das Cruzes - SP
(3) Rua Presidente Rodrigues Alves, 116 - apto. 11 - Centro - 08710-170 - Mogi das Cruzes - SP

7.4 CEP: 7.5 Telefone: ()

() continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo n.º 127/97**

() em anexo

9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial** (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo n.º 127/97):

() em anexo

10. **Procurador (74):**

10.1 Nome e CPF/CGC:

LUCAS MARTINS GAIARSA, brasileiro, casado, engenheiro, advogado
API 901

10.2 Endereço:

Av. Brigadeiro Faria Lima, 1485 - 12º andar - São Paulo - SP

10.3 CEP: **01451-904** 10.4 Telefone: **(011) 38.19.45.45**

11. **Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o n.º total de somente uma das vias de cada documento)

X	11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	X	11.5 Relatório descritivo	60 fls.
X	11.2 Procuração	02 fls.	X	11.6 Reivindicações	18 fls.
	11.3 Documentos de prioridade	fls.	X	11.7 Desenhos	11 fls.
	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	X	11.8 Resumo	01 fls.
	11.9 Outros (especificar):				fls.
X	11.10 Total de folhas anexadas:				93 fls.

12. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

São Paulo, 30/08/2002

Local e Data


LUCAS MARTINS GAIARSA
API 901

**"COMPOSTO CICLOPALADADO, COMPOSIÇÃO E UNIDADE DE
DOSAGEM, SEUS USOS, MÉTODO PARA INIBIR A ATIVIDADE DE
PROTEÍNAS E ENZIMAS E MÉTODO DE TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS
OU DOENÇAS ASSOCIADAS ÀS MESMAS E MÉTODO DE MODULAÇÃO
DO SISTEMA IMUNOLÓGICO"**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção trata de compostos ciclopalladados contendo ligantes bis-difenilfosfina-ferroceno e seus análogos como ativos inibidores de peptídeos e enzimas compreendendo as famílias de serino-peptidases, cisteíno-proteases, metalo-proteases, endopeptidases, muitas das quais essenciais no mecanismo de desenvolvimento e metástase de tumores malignos. Atuando sobre essas enzimas e participando de interações com moléculas de DNA, esses compostos modulam o sistema imunológico.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O estudo da química inorgânica no campo farmacêutico vem recebendo especial atenção dos pesquisadores devido às evidentes vantagens de sua utilização sobre medicamentos tradicionais no tratamento de uma série de patologias.

O Fármaco inorgânico mais estudado é a cis-platina, uma droga que vem sendo clinicamente utilizada no tratamento de grande número de tumores. Acredita-se que sua ação se dá através de interação com o DNA impedindo assim a proliferação das células tumorais (Lippard, Science 218:1075-1082 (1982); Rosenberg, Nature 222:385 (1969); Cleare et al., Bioinorg. Chem. 2:187 (1973)). Este composto, eficiente no combate a vários tipos de tumores, apresenta uma alta citotoxicidade, sendo a mesma, extensiva também para células normais (Ebert U, Löffler H, Kirch W, Pharmacology & Therapeutics, 74: (2) 207-220 1997; Spencer CM, Goa KL, Drugs, 50: (6) 1001-1031 DEC 1995).

Complexos à base de ouro têm sido usados no tratamento da artrite e seu mecanismo de atuação envolve a ligação a um grupo tiol das proteínas, impedindo a formação de pontes dissulfeto podendo acarretar a denaturação das mesmas.

5 Complexos metálicos de cobalto também já foram apontados como apresentando atividade antiviral, antitumoral, e antimicrobiana além de propriedades antiinflamatórias.

10 Compostos metálicos que podem trocar ou se ligar a sítios funcionais de proteínas resultando na inativação de suas atividades biológicas são descritos na patente US 5.880.149. O documento revela alguns complexos de paládio (pertencente à classe dos compostos de coordenação), como inibidores irreversíveis de cisteíno-proteases, como potentes drogas antitumorais e como drogas muito eficientes em inúmeros processos infecciosos, onde o mecanismo de ação de cisteíno-proteases, esteja
15 envolvido. Como exemplo mencionamos a inibição enzimática provocada pelos complexos de paládio sobre as Catepsinas B, H, J, L, N, S, T e C e sobre a Enzima Conversora de Interleucina (ICE), constituindo-se em drogas ativas contra Amebíases, Tripanossomíases e Leishmanioses. A patente americana é o trabalho mais recente desenvolvido no que concerne ao desenvolvimento e
20 mecanismos de ação de drogas antitumorais, envolvendo compostos do elemento químico paládio.

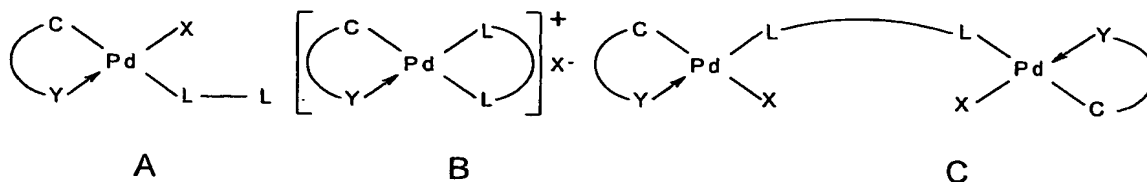
DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

25 A presente invenção trata de complexos de paládio inéditos (pertencente à família de compostos organometálicos), contendo uma ligação Sigma C - Pd e uma ligação de coordenação $Y \rightarrow Pd$, dando origem a um ciclo orgânico, razão pela qual se designa esses compostos por ciclopaladados, também conhecidos como paladaciclos.

Os compostos abraçados pela presente invenção podem ser

definidos pelas estruturas genéricas A, B ou C do Esquema 1 abaixo:

ESQUEMA 1



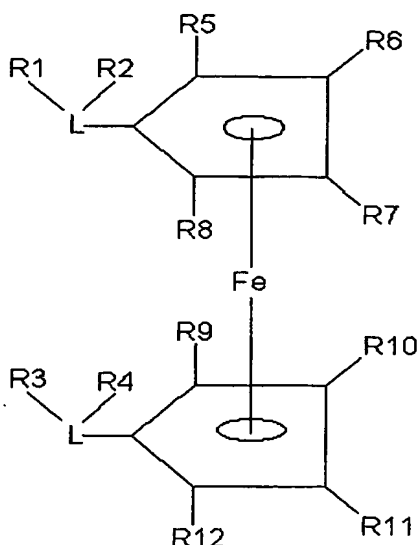
Onde:

- X representa um elemento escolhido dentre seguintes grupos:
 halogênio (Cl, F, Br, I);
 pseudo-halogênio (N₃, NCO, NCS, SCN); ou
 Acetato (H₃C-COO⁻); e
- Y representa um elemento do grupo V ou VI da Tabela Periódica, por exemplo N, P, As, Sb, Bi, O, S, Se, Te,
- C representa um átomo de carbono com hibridização sp² ou sp³, ligado ao átomo de paládio de forma covalente. O anel contendo C, Y e D pode ser constituído de 3 a 8 átomos
- Entre C e Y, representado por um traço curvo, há uma sucessão de átomos, referida como anel ciclopaladado, constituída de 3 a 8 átomos, incluindo o átomo de paládio. De forma típica, sem excluir qualquer outra, tais átomos são escolhidos entre carbono, nitrogênio, oxigênio ou enxofre. Cada um desses átomos componentes do anel pode, por sua vez, ser ligado a outros átomos ou grupamentos, formando estruturas variadas externamente ao anel, lineares ou cíclicas, sem que qualquer limitação específica seja conhecida da Depositante.
- L representa um ligante que é um átomo doador do grupo V da Tabela Periódica (N, P, As, Sb, Bi), dentro de um composto bis-difenilfosfina-ferroceno conforme detalhado no Esquema 2 abaixo, sendo a representação esquemática L-L indicativa da presença de dois ligantes L na

8h

estrutura do dito composto bis-difenilfosfina-ferroceno, e R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 e R12 representam individualmente os seguintes radicais, que podem se apresentar em qualquer ordem : hidrogênio (H), alquil, aril, dienil, alcóxi, silóxi, hidróxi (OH), amino (-NH₂), imida, halogênio (F, Cl, Br, I),
 5 Imina, nitro (-NO₂).

ESQUEMA 2



Dependendo da proporção de ligante bis-difenilfosfina-ferroceno utilizada na síntese, bem como do solvente, podem ser gerados compostos moleculares mononucleares (estrutura 1A, um ciclopaladado mono-dentado),
 10 iônicos mononucleares (estrutura 1B, um ciclopaladado bidentado quelante) e moleculares binucleares (estrutura 1C, um ciclopaladado bidentado em ponte). Os compostos das estruturas 1A e 1B, são obtidos quando se utiliza a proporção de 2 moles do ligante bidentado L-L, para 1 mol dos complexos de partida. Os compostos mostrados em 1C são obtidos quando se utiliza uma
 15 razão molar de 1:1.

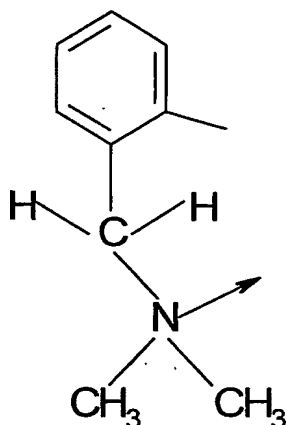
Neste trabalho a representação $[Pd(C^2, N-(S-dmpa)(dppf)Cl]$ indica um complexo de paládio molecular, mononuclear com o ligante dppf do tipo monodentado, conforme esquema 1A, a representação $[Pd(C^2, N-(S-$

$dmpa)(dppf)]Cl$ indica um complexo de paládio mononuclear iônico com o ligante dppf atuando como bidentado quelante, conforme esquema 1B e $[Pd_2(C^2,N-R^+ dmpa)_2(\mu -dppf)Cl_2]$ indica um complexo de paládio molecular dinuclear contendo o ligante dppf atuando como ligante bidentado em ponte.

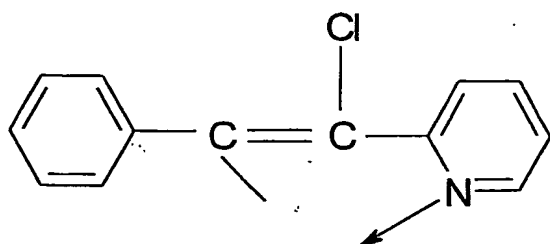
10f

5 Em uma realização particular da presente invenção os ciclopaladados obtidos são representados nos Esquemas 3 e 4 abaixo, respectivamente derivados da N,N-dimetil-benzilamina (esquema.3) e dos alcinos piridinil-fenil-etino (esquema. 4A) e 1-fenil-3-N,N-dimetilamino-propino (esquema 4B).

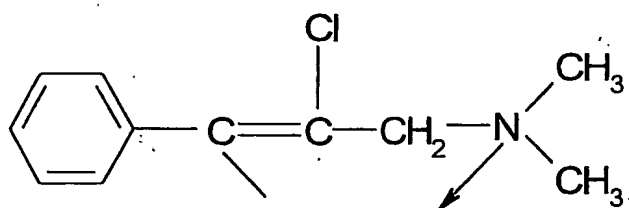
10 ESQUEMA 3



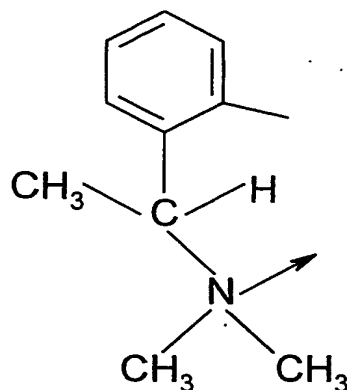
15 ESQUEMA 4A



ESQUEMA 4B

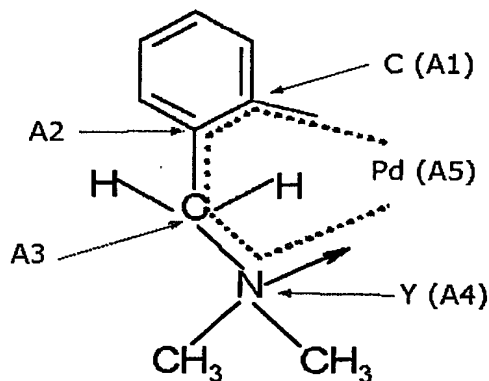


20 Uma realização ainda mais particular da presente invenção é o N,N-dimetil-1-fenetilamina (dmpa). O Esquema 5 abaixo representa o anel ciclometalado formado pelos isômeros da N,N-dimetil-1-fenetilamina (dmpa) - enantiômero R(+) e enantiômero S (-).

ESQUEMA 5

12/

A título meramente explicativo, as ilustrações dos esquemas de 3 a 5 acima, mostram o anel ciclopaladado, que deve ser entendido conforme configuração explicitada no esquema 6 abaixo (tomando-se a estrutura do esquema 3 como exemplo):

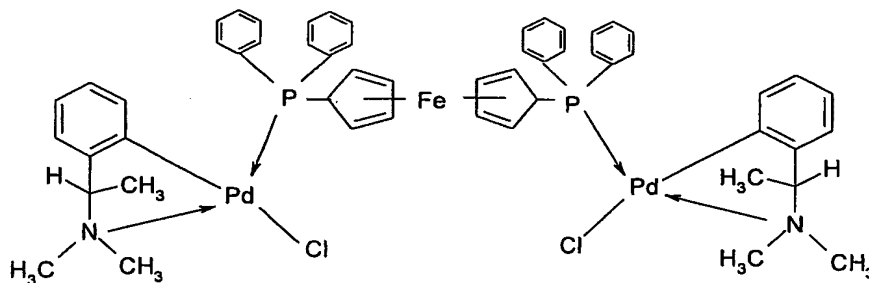
ESQUEMA 6

Nessa figura o anel ciclopaladado compreende 5 átomos, indicados como A1 a A5, inter-relacionados como precetado anteriormente, ou seja:

- um átomo de carbono (A1) está ligado ao paládio (A5) por uma ligação sigma;
- um átomo de nitrogênio (A4, na fórmula geral definido genericamente como Y) está ligado ao paládio por uma ligação covalente dativa;

- 12/2

15



O grande grupo de ciclopalladados obtidos de acordo com a presente invenção, especialmente os compostos derivados dos enantiômeros R(+) e S(-) do ligante orgânico N,N-dimetil-1-fenetilamina (trietilamina), representado por (dmpa) e contendo em suas estruturas o ligante de coordenação 1,1'-bis-difenilfosfina-ferroceno, são compostos que podem representar muitas vantagens como fármacos, no tratamento de grande variedade de enfermidades.

13p

Este fato se deve à capacidade desses compostos de inibirem enzimas e proteínas compreendendo as pertencentes às famílias tanto das cisteíno - proteases (Catepsina B), das serino - peptidases (prolil - oligopeptidases), como também da Enzima Conversora de Angiotensina (ACE ou ECA) e da Catepsina D. Inibidores destas enzimas ou proteínas por meio de complexos ciclopaladados não foram anteriormente descritos, e embora estes complexos sejam sintetizados por métodos conhecidos, os compostos contendo os ligantes Bis-difenilfosfina-ferroceno são absolutamente novos.

O mecanismo de ação dos compostos de acordo com a presente invenção se dá de forma principalmente reversível sobre enzimas ou proteínas, agindo principalmente no complexo Enzima-Substrato. Esta reversibilidade implica em uma citotoxicidade baixa e diminuição de efeitos colaterais indesejáveis, quando administrado como drogas, não afetando porém, sua eficiência como fármacos.

O efeito de inibição apresentado pelos complexos ciclopaladados sobre uma gama de grupos de enzimas aos quais pertencem por exemplo a Catepsina B, a família das prolil-oligopeptidases, a Catepsina D e a Enzima Conversora de Angiotensina (ACE), resulta em propriedades de imunomodulação desses compostos. Os efeitos de inibição e imunomodulação, conferem aos ciclopaladados em questão propriedades antimetastáticas, antiangiogênicas e de envolvimento na apoptose celular, constituindo-os em drogas, particularmente no tratamento de doenças correlacionadas a essas proteínas, e de forma ainda mais particular contra tumores malignos sólidos ou ascíticos (sangue e sistema linfático).

Os ciclopaladados de acordo a presente invenção representam fármacos no combate ao câncer da tireóide, contra o qual até hoje não se tem quimioterápico específico, e neuroblastomas. Isto se deve principalmente à capacidade de inibição sobre a Catepsina D e proteção de células da medula

óssea, causada por interferência dos ciclopaladados sobre o sistema imunológico. Essas características conferem aos compostos aqui descritos ação de proteção imunológica contra efeitos secundários indesejáveis em tratamentos que envolvam emprego de radioterapia.

5

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 apresenta o efeito do composto ciclopaladado sobre a atividade da catepsina B.

As Figuras 2A e 2B apresentam respectivamente espectros de CD/interação com moléculas de DNA.

A Figura 3 apresenta o Tumor de Walker (10 dias) em uma cobaia não tratada.

A Figura 4 apresenta uma cobaia tratada (10 dias) sem vestígio tumoral (Tumor de Walker).

A Figura 5 apresenta uma cobaia com tumor de Walker (10 dias), sendo que o lado direito não foi tratado (12 g de massa tumoral) e o lado esquerdo foi tratado localmente (2 g de massa tumoral).

A Figura 6 apresenta a sobrevivência de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados (via subcutânea) com 1 mg/kg dos compostos $[Pd(C^2, N-(S-dmpa)(dppf)Cl]$ ou $[Pd(C^2, N-(S-dmpa)(dppf)(N_3)_2]$ por 4 dias consecutivos. Os animais foram inoculados com células tumorais (1×10^6 células/ml) e 72 horas após este procedimento foi iniciado o tratamento com os compostos em estudo. ($p < 0.05$ Kaplan-Meier, Cox-Mantel).

A Figura 7 apresenta o número de células não aderentes no sobrenadante das culturas de longa duração incubadas com 1 mg/kg do composto ciclopaladado $[Pd(C^2, N-(S-dmpa)(dppf)Cl]$. As células não aderentes foram removidas semanalmente e quantificadas (* $P < 0.05$ ANOVA, Tukey).

A Figura 8 apresenta o número de colônias de células precursoras

hematopoiéticas para granulócitos/macrófagos (CFU-GM) obtido no sobrenadante das culturas de longa duração de células da medula óssea de animais normais tratadas com 1 mg/kg do compostos ciclopaladados $[Pd(C^2, N-(S-dmpa)(dppf)Cl]$. As células não aderentes foram removidas semanalmente e o número de CFU-GM quantificado ($P < 0.05$ ANOVA, Tukey).

15b

A Figura 9 apresenta o número de células aderentes nas culturas de longa duração de células da medula óssea de animais normais tratadas com 1 mg/kg do composto ciclopaladados $[Pd(C^2, N-(S-dmpa)(dppf)Cl]$ semanalmente. As células aderentes foram removidas no final da cultura (9ª semana) ($P < 0.05$ - Wilcoxon).

A Figura 10 apresenta a percentagem de sobrevida celular de células HL60 incubadas por 72 horas com vários compostos ciclopaladados.

A Figura 11 apresenta a percentagem de sobrevida celular de células K-562 incubadas por 72 horas com vários compostos ciclopaladados.

A Figura 12 apresenta o aspecto morfológico de uma célula HL60 incubada com o composto ciclopaladados $[Pd(C^2, N-(S-dmpa)(dppf)Cl]$ por 72 horas. É possível observar claramente os aspectos de uma célula em apoptose, como a fragmentação nuclear com formação de núcleos picnóticos (coloração: hematoxilina de Harry's – aumento 400 x).

A Figura 13 apresenta o efeito citotóxico dos complexos ciclopaladados.

A Figura 14 apresenta a atividade antitumoral *in vivo* dos ciclopaladados a 10 μM .

A Figura 15 apresenta a atividade antitumoral *in vivo* dos ciclopaladados a 30 μM .

A Figura 16 apresenta a atividade antitumoral *in vivo* de compostos análogos a droga 1, contendo agora como ciclometalante alcinos funcionalizados.

EFEITO DE INIBIÇÃO SOBRE CISTEÍNO-PROTEASES

CATEPSINA B

16p

Cisteíno-proteases constituem uma família de enzimas que possuem um grupo tiol (-SH) no sítio ativo. Possuem a capacidade de clivar ligações amida por uma interação sinérgica entre uma cisteína específica e uma histidina no sítio ativo, por mecanismo conhecido (Patente US 5.880.149). Essas proteínas são encontradas em bactérias, vírus, microorganismos eucariotos, plantas e animais, possuindo quatro ou mais superfamílias. A inibição da enzima Catepsina B pelos compostos ciclopaladados de acordo com a presente invenção, foi inicialmente apontada como a principal causa da atividade antitumoral exibida por esses compostos. Porém, a atividade dos compostos de acordo com a presente invenção não é limitada a esta cisteíno-protease, e seu uso como fármacos não deve ser restrito ao combate ao câncer.

Os compostos ciclopaladados aqui descritos são inibidores ativos das cisteíno-proteases: Catepsinas B, H, J, L, N, S, T e C (dipeptidil-peptidase-I), Enzima Conversora de Interleucina (ICE), proteases neutras ativadas por cálcio, Calpaína I e II, cisteíno-proteases virais, como por exemplo endopeptidase de cardiovírus, endopeptidase de adenovírus e endopeptidase de aftovírus, e proteases essenciais no ciclo de vida de parasitas como por exemplo às proteases das espécies de Plasmodium, Entamoebas, Onchoceras, Leishmanias, Haemonchus, Dictyostelium, Therilerium, Esquistossomas, Tripanossomas (T. cruzi, esta enzima é também conhecida como cruzaina ou cruzipaina). Uma lista completa de cisteíno-proteases que podem ser inibidas por esses compostos é dada por Rawlings et al (*J. Biochem.* 290:205-218-1993), e por Sajid M. et al (*Molecular and Biochem. Parasitology*, 120: (1) 1-21, 2002).

Dessa forma, o emprego dos ciclopaladados como fármacos

envolve um espectro amplo. Em particular na sua atuação como inibidores das Catepsinas B, L, S, Cruzaina e Enzima Conversora de Interleucina-1 β , que são proteases lisossomais, relacionadas a inúmeros processos de doenças causadas por degradação de tecidos, um grupo que compreende artrites, distrofia muscular, invasão tumoral, glomeronefrites, infecções ósseas por parasitas, doenças periodontais e metástase tumoral entre outras.

17p

Schotte et al., em seu trabalho para JBC (Vol.276, N $^{\circ}$. 24, Issue of June 15, pp. 21153-21157, 2001), comprova que inibidores da Catepsina B, previnem a produção de Interleucina-1 α , Interleucina-1 β e fator de necrose tumoral a nível transcricional, podendo também estar envolvidos na inibição do potencial de transativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), resultante de expressão gênica. Os ciclopalladados apresentando, dessa forma, atividade inibitória sobre a Catepsina B e sobre NF- κ B, constituem fármacos ativos em um grande número de doenças inflamatórias como por exemplo bronquites, artrites reumatóides, osteoporose, pancreatite aguda e progressões do câncer.

EFEITO DE INIBIÇÃO SOBRE SERINO-PEPTIDASES

PROLIL-OLIGOPEPTIDASE

Prolil-oligopeptidase constitui uma família de enzimas pertencente ao grupo das serino-peptidases, que não conseguem hidrolisar peptídeos com mais de trinta resíduos. Este grupo compreende dipeptidil-peptidase IV, acilaminacil-peptidase e oligopeptidase B além do protótipo prolil-oligopeptidase. Determinação recente da estrutura cristalina da prolil-oligopeptidase (80 kDa) mostra que a enzima contém um domínio de peptidase com um alfa/beta hidrolase dobrada e sua tríade catalítica é constituída por um túnel central possuindo uma estrutura incomum beta-pregueada com sete lâminas, domínio que opera como filtro de grandes peptídeos. A inibição das enzimas desta família é importante fonte de desenvolvimento de novas drogas, uma vez que as prolil-oligopeptidases estão envolvidas em um grande número

de distúrbios como a amnésia, controle da depressão e pressão sangüínea, atuando também como importantes Chaperonas em transportes de proteínas através de membranas do retículo endoplasmático e mitocôndrias (Sharova, E.I.; *Russian Journal of Plant Physiology*, 49(2), 255, 2002).

18p

- 5 A dipeptidil-peptidase IV está envolvida na diabetes e a oligopeptidase-B em tripanossomias - Polgar L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59 (2), 349-62, 2002. e Folop, V. et al. *Cell*, 94(2), 161-70, 1998. Além disso, Maes, M. et al. em *Psychoneuroendocrinology*, 26 (1), 17-26, 2001, comprovam o envolvimento desta enzima em distúrbios alimentares, bulimia
- 10 nervosa e anorexia. É comprovada também a atividade da prolil-endopeptidase (PEP) e dipeptidil-peptidase IV. (DPP IV) no alcoolismo, na produção de citocinas e receptores de citocinas tais como, interleucina-6 (IL-6), fator alfa de necrose tumoral (TNF-alpha), interferon-gama (INFN-gamma), receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA), IL-10, e fator estimulante de crescimento de
- 15 colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), sendo que a diminuição da concentração de PEP e DPP IV aumenta a produção desses fatores (Maes, M.; et al. *Alcohol*, 17 (1), 1-6, 1999). A alta atividade dessas enzimas no organismo humano, também está relacionada com o stress psicológico segundo Maes, M. e colaboradores em *Psyconeuroendocrinology*, 23 (5), 485-495, 1998.
- 20 A DPP IV, também conhecida como CD26; EC 3.4.14.5, é um receptor de glicoproteínas com múltiplas funções, incluindo adesão celular, transportador celular através da matriz extracelular e potencial co-estimulador durante a ativação de células T. Por ser uma exopeptidase a mesma torna-se uma chave regulatória do metabolismo de peptídeos hormonais. Inibidores
- 25 seletivos desta enzima possuem, entre outras, aplicação no tratamento da diabetes do tipo II, doença na qual esta enzima participa de ciclos complexos de regulação como descrito por Hildebrandt e colaboradores em *Clinical Science*, 99 (2), 93-104, 2000.

Um trabalho de revisão mostra as propriedades da DPP IV e dos potenciais terapêuticos de seus inibidores (Augustyns, K.; Bal, G.; Thonus, G.; Belyaev, A.; et al. *Current Medicinal Chemistry*, 6(4), 311-327, 1999), evidenciando sua função como antígeno do leucócito CD26 e sua atuação sobre os novos substratos glucagon quemoquinas. O trabalho aborda também a potencialidade terapêutica de seus inibidores no combate das infecções causadas pelo vírus HIV (Aids) e suas correlações com o sistema imunológico.

19f

Joyeau e colaboradores por sua vez comprovaram que a prolil-oligopeptidase específica Tc80, é essencial para o metabolismo do *Tripanossoma cruzi*, sendo seus inibidores, potenciais fármacos contra a doença de Chagas (*European Journal of Medicinal Chemistry*, 35(2), 257-266, 2000).

A oligopeptidase B é um membro da nova família de serino-peptidases, encontrada em bactérias Gram-negativas e *Tripanossomas* (Juhasz, T.; Szeltner, Z.; Renner, V.; Polgar, L. *Biochemistry*, 4(12), 4096-4106, 2002) O *Tripanossoma brucei* contém a serino-oligopeptidase (OP-Tb), liberada pelo hospedeiro na circulação sanguínea durante a infecção da *Tripanossomia Africana* (Morty, R.E.; Lonsdale-Eccles, J.D.; Morehead, J. et al. *Journal Of Biological Chemistry*, 274(37), 26149-156, 1999).

Endopeptidases neutras também são responsáveis pelas propriedades regulatórias da Angiotensina II (Maric, C.; Walther, T. - *FASEB JOURNAL*, 16(4), A93, Part 1, 2002), ficando evidente o envolvimento dessa classe com as propriedades descritas para a ACE e também sua relação com a imunomodulação (Inguibert, N. et al; *Journal of medicinal Chemistry*, 45(7), 1477, 2002).

CATEPSINA D

A Catepsina D é uma endopeptidase acídica, servindo como fator de prognóstico do câncer de mama (Kraimps JL, Metaye T, Millet C, Margerit D,

Ingrand P, Goujon JM, Levillain P, Babin P, Begon F, Barbier J. *Surgery* 1995 Dec;118(6):1036-40), sendo também expressas em alta concentração nos carcinomas medulares e tumores da tireóide (Holm R, Hoie J, Kaalhus O, Nesland JM. *Virchows Arch* 1995;427(3):289-94). A atividade da Catepsina D é

5 respectivamente maior em células cancerosas, adenomas e doenças graves da glândula tireóide que em células normais, sendo sua localização a mesma tanto em células tumorais como normais (Metaye T, Kraimps JL, Goujon JM, Fernandez B, Quellard N, Ingrand P, Barbier J, Begon F. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Oct;82(10):3383-8). Nos carcinomas cutâneos (melanoma e

10 nevos) as atividades das Catepsinas B e L são grandes. A Catepsina D é expressa em altos níveis somente em melanoma. A atividade da Catepsina H está inversamente relacionada com o potencial invasivo da lesão (Frohlich E, Schlagenhauff B, Mohrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G. *Cancer* 2001 Mar 1;91(5):972-82). Catepsina D, nm23, EGFR e LR (detectados por

15 imunohistoquímica), são potenciais marcadores para a distância do espalhamento metastático em câncer de mama com nódulo negativo, sendo a combinação dos três primeiros uma abordagem mais promissora (Niu Y, Fu X, Lv A, Fan Y, Wang Y. *Int J Cancer* 2002 Apr 10;98(5):754-60). Análises imunohistoquímicas mostram que a expressão da Catepsina D por células

20 cancerosas está associada com a profundidade da invasão do tumor tanto gástrico como intestinal (Ikeguchi M, Fukuda K, Oka S, Yamaguchi K, Hisamitsu K, Tsujitani S, Sakatani T, Ueda T, Kaibara N. *Oncology* 2001;61(1):71-8). A expressão da Catepsina D está relacionada com a expressão da proteína p53 em células cancerosas do esôfago de acordo com

25 análise imunohistoquímica. A Catepsina D não foi detectada em células sadias do esôfago. A alta expressão da Catepsina D está significativamente associada com o crescimento invasivo do tumor (Ikeguchi M, Sakatani T, Ueda T, Fukuda K, Oka S, Hisamitsu K, Yamaguchi K, Tsujitani S, Kaibara N. *J Clin Pathol* 2002

20/6

Feb;55(2):121-6). Testes em ratos indicam que a Catepsina D está diretamente ligada ao processo de metástase tumoral, através da transferência do vetor de expressão da Catepsina D humana em câncer de mama. Os inibidores desta enzima, caso onde se inserem os ciclopaladados em questão, influenciam diretamente na diminuição ou impedimento da metástase tumoral (Marcel Garcia, Nadine Platet, Emmanuelle Liaudet, Valérie Laurent, Danielle Derocq, Jean-Paul Brouillet, Henri Rochefort. *Stem Cells* 1996; 14:642-650).

21p

Os compostos de paládio de acordo com a presente invenção são eficientes inibidores da Catepsina D. Os mesmos mostraram-se, paralelamente, eficientes inibidores de tumores da tireóide em doses de cerca 1 a cerca de 10 μ g. Foram estudadas 3 linhagens de células desses tumores: WRO, NPA, ARO, demonstrando que os compostos aqui descritos podem ser utilizados no desenvolvimento de um fármaco eficiente, contra um tipo de tumor para o qual praticamente não existe tratamento por um quimioterápico. Este fato associado à ação imunomoduladora dos compostos ciclopaladados, impedindo células jovens da medula óssea de entrarem em divisão celular (fase S), fazem desses compostos fármacos promissores em tratamentos conjuntos de tumores tireoideano envolvendo radioterapia, impedindo efeitos colaterais indesejáveis, como por exemplo, a leucemia.

É comprovado que a inibição da protease lisossomal com inibidores enzimáticos gera a morte de células de neuroblastomas (Castino R, Pace D, Demoz M, Gargiulo M, Ariatta C, Raiteri E, Isidoro C. *Int J Cancer* 2002 Feb 20;97(6):775-9). Sob este aspecto os ciclopaladados aqui apresentados representam uma opção de tratamento deste tipo de câncer, principalmente em crianças onde o mesmo é muito agressivo, sem os problemas advindos do uso dos compostos conhecidos.

EFEITO DE INIBIÇÃO SOBRE METALO-PROTEASES

ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ACE)

A enzima conversora de angiotensina faz parte do grupo das metalo-proteases, contendo Zinco em um de seus sítios ativos, está relacionada com a conversão de Angiotensina I em Angiotensina II. A enzima possui dois domínios, designados por domínio C e domínio N, ou seja, possui dois centros ativos. A Angiotensina II induz a proliferação de células progenitoras do Sistema Hematopoiético (HPC), enquanto a Angiotensina I, inibe esta proliferação. Por outro lado, o peptídeo Acetyl – N – Ser – Asp – Lys - Pro (AcSDKP), que também é um substrato da enzima ECA, é um regulador da proliferação de células progenitoras do Sistema Hematopoiético.

Na literatura encontram-se inúmeros relatos da influência e do mecanismo desses substratos (Angiotensina I, Angiotensina II e o peptídeo AcSDKP), na modulação do sistema imunológico como os mencionados a seguir:

- Chisi et al. ("Inhibitory action of the peptide AcSDKP...", *Stem Cells* 1997;15:455-460) descrevem o uso da combinação do AcSDKP com inibidores apropriados da ACE na regulação da proliferação de células hematopoiéticas *in vitro*. É verificada uma inibição significativa do ciclo de células jovens pela ação do peptídeo AcSDKP na presença de captopril, um inibidor eficiente da ACE, exercendo um efeito no sítio ativo N da enzima.
- Chisi em outro artigo ("Captopril inhibits the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells ...", *Stem Cells* 1999;17:339-344) ainda revela que Drogas usadas no tratamento da hipertensão como os inibidores da ACE podem causar pancitopenia mas a causa disto ainda é desconhecida.

Estudos demonstraram que o captopril não apresentou toxicidade para as células da medula óssea, porém diminui a proporção de macrófagos da fase S; esses resultados indicam que o captopril causa mielosupressão.

➤ Azizi et al. ("Angiotensin I-converting enzyme...", *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001 Dec;28(12):1066-9), descrevem que o AcSDKP é hidrolisado pela ACE *in vitro* e é um substrato preferencial do N-terminal do sítio ativo desta enzima, mas também é um peptídeo natural hidrolisado pelo N-terminal do sítio ativo da ACE *in vivo*. A ACE pode então regular a hematopoiese pela permanente degradação deste inibidor natural circulando nas células da fase S. O peptídeo fosfínico RXP407 (um inibidor seletivo do domínio N da ACE *in vitro*) não interfere na regulação da pressão sanguínea.

➤ Aidoudi e colaboradores ("The tetrapeptide AcSDKP reduces...", *Int J Hematol* 1998 Aug;68(2):145-55) testaram a proteção do AcSDKP em células progenitoras de CFU-MK e CFU-GM de camundongos tratados com uma dose baixa de citosina arabinosida (Ara-C) tanto em testes *in vitro* como *in vivo*. Mostrou-se que a administração de AcSDKP antes de iniciar-se tratamento com Ara-C resulta num aumento significativo de CFU-GM, CFU-MK e maturação do número de células MK de 6 a 8 dias após a primeira injeção de Ara-C. Resultados demonstraram efeito protetor de AcSDKP para células progenitoras durante tratamento com Ara-C.

➤ Rousseau-Plasse ("Lisinopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor...", *Exp Hematol* 1998 Oct;26(11):1074-9) relata a administração oral de inibidor de ACE em humanos tem aumentado a concentração de AcSDKP no plasma. Foi estudado *in vivo* o efeito do lisinopril no estado proliferativo de células hematopoiéticas de camundongos na fase S desencadeada por irradiação. A administração de lisinopril uma hora após a irradiação inibiu 100% a atividade do plasma murino da ACE em

23p

decorrência do aumento no nível de plasma endógeno de AcSDKP.

- Li et al. ("Production and consumption of the tetrapeptide AcSDKP...", *Exp Hematol* 1997 Feb;25(2):140-6) analisaram o papel do microambiente celular humano no metabolismo do AcSDKP usando-se cultura de células de medula de longo período long-term (LTMC). Os resultados obtidos foram que: macrófagos sintetizam e liberam no sobrenadante AcSDKP; células do estroma degradam o peptídeo via ACE; e componentes da matriz extracelular e da LTMC servem como um reservatório para o peptídeo.

Ao se avaliar os efeitos dos compostos da presente invenção no sistema de cultura líquida de longa duração (exposição prolongada *in vitro*), que permite avaliar os efeitos do composto sobre a formação do estroma medular (tecido formado por fibroblastos, células sinalizadoras de lipídios, células endoteliais entre outras), que é responsável pela sustentação das células jovens da medula óssea (*stem cell*), foi determinado que a exposição prolongada a estes compostos, particularmente aqueles contendo o ligante 1,1'-bis-difenilfosfina-ferroceno, conforme representando nas estruturas genéricas A e B descritas, aumentam de forma significativa às células aderentes do estroma medular quando comparados ao controle. Por outro lado, uma diminuição no número de células não aderentes do sobrenadante das culturas líquidas e uma diminuição no número de colônias de células (CFU-GM) obtidas a partir do sobrenadante destas culturas foi observada. Este padrão de resposta tem sido observado com drogas inibidoras da enzima conversora da angiotensina (ECA), como o captopril. estudos acima citados demonstram que esta droga inibe a ECA, aumentando a concentração do tetrapeptídeo AcSDKP (substrato da ECA), o qual é produzido pelas células do estroma medular e atua impedindo que as células pluripotentes da medula óssea entrem para o ciclo celular. Tal fato é particularmente interessante, uma vez que drogas quimioterápicas atuam particularmente na fase S do ciclo

24h

25/

celular (síntese de DNA), atingindo não somente as células malignas, assim como aquelas dos tecidos de renovação rápida como a medula óssea. A interrupção temporária do ciclo celular produzida pelo ciclopalladado está associada a uma maior proteção às células da medula óssea dos efeitos mielo-tóxicos da quimioterapia convencional.

Os compostos de acordo com a presente invenção são imunomoduladores, pois a diminuição reversível da proliferação de células da medula óssea (granulócitos e macrófagos) está associada a uma menor atividade fagocítica e diminuição na liberação de interleucina 1 pelos macrófagos com conseqüente diminuição na estimulação de linfócitos, os quais por sua vez também estão envolvidos na progressão das doenças auto-imunes. Portanto, os compostos aqui descritos são úteis como imunossuppressores.

MECANISMO

O mecanismo de ação dos compostos de acordo com a presente invenção se dá de forma principalmente reversível o que resulta em uma citotoxicidade baixa e diminuição de efeitos colaterais indesejáveis.

Sem nos prendermos a aspectos teóricos, o mecanismo de inibição enzimática é apresentado, por exemplo, aquele dos complexos ciclopalladados iônicos contendo ligante **dppf** bidentado do tipo $[Pd(C^2,N-dmpa)(dppf)]X$. Inicialmente ocorre a quebra de uma ligação de coordenação entre o átomo de fósforo do ligante bifosfínico e o íon $Pd(II)$ com uma coordenação simultânea de uma molécula do solvente DMSO, produzindo-se assim o complexo $[Pd(C^2,N-dmpa)(dppf)(DMSO)]X$. Os mesmos complexos contendo DMSO (ou outro solvente coordenante como dimetilformamida, piridina, THF, dentre outros), são formados por complexos ciclopalladados do tipo molecular $[Pd(C^2,N-dmpa)(dppf)X]$, com a migração em solução de um íon X^- para fora da esfera de coordenação do metal. A partir dos complexos

ciclopaladados apresentando ligantes dppf em ponte do tipo $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmpa})_2(\mu\text{-dppf})_2\text{X}_2]$, os complexos $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{dppf})(\text{DMSO})]\text{X}$ são produzidos por decomposição parcial do complexo em solução de DMSO/água devido à falta de estabilidade dos mesmos em soluções de DMSO. O fato é mais evidente quando Pd(0) é formado após alguns minutos da dissolução dos complexos em solução de DMSO. A solução do complexo $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmpa})_2(\mu\text{-dppf})_2(\text{N}_3)_2]$ em nitrometano mostra aumento de condutividade molar de 9.3 S.cm² para 60 S.cm² a 25°C, pela adição de algumas gotas de DMSO.

Em um próximo estágio, o complexo $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{dppf})(\text{DMSO})]\text{X}$, por ruptura da ligação coordenada N-Pd e coordenação da nova molécula de DMSO produzem-se o complexo $[\text{Pd}(\text{C}^2\text{-dmpa})(\text{dppf})(\text{DMSO})_2]\text{X}$. Esta última molécula organometálica gerada em solução será o inibidor efetivo da ação enzimática.

Considerando-se o fato de que o ligante dppf livre e nenhum outro complexo formado por outras classes de ligantes bifosfínicos, foram capazes de inibir a atividade enzimática, conclui-se que o fenômeno de inibição é altamente dependente do ligante dppf, bem como da estrutura química do complexo de paládio. Dessa forma acreditamos que o inibidor organometálico produzido em solução, ou seja o complexo $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{dppf})(\text{DMSO})]\text{X}$, entra em equilíbrio dinâmico com o complexo intermediário tetraédrico produzido pela associação entre o par de íons tiolato-imidazol com o substrato. Esta interação ocorre com a participação dos dois centros metálicos existentes no complexo (Pd, Fe). Nesté modelo o grupo acila de alta densidade de cargas negativas interage com o íon Pd(II) por simultâneo deslocamento de uma molécula de DMSO, coordenando-se a um átomo de enxofre altamente ativado do grupo cisteína, o qual, por sua vez, interage com o átomo de ferro do ligante dppf. O equilíbrio das espécies em solução origina um mecanismo de inibição reversível.

26f

A presente invenção trata de compostos ciclopaladados que compreendem ligantes bis-difenilfosfina-ferroceno e outros ligantes análogos, contendo átomos doadores do mesmo grupo fósforo como ativos inibidores de proteínas, particularmente enzimas. Atuando sobre essas enzimas e participando de intercalações com moléculas de DNA, esses compostos modulam o sistema imunológico.

Em realização particular as enzimas cuja atividade é inibida pelos compostos da presente invenção são pertencentes às famílias das serino-peptidases, cisteíno-proteases, metalo-proteases e endopeptidases.

Em realização mais particular da presente invenção as cisteíno-proteases inibidas pelos compostos aqui revelados são Catepsina B, H, J, L, N, S, T e C (dipeptidil-peptidase-I), Enzima Conversora de Interleucina (ICE), proteases neutras ativadas por cálcio, Calpaína I e II, cisteíno-proteases virais, como por exemplo endopeptidase de cardiovírus, endopeptidase de adenovírus e endopeptidase de aftovírus, e proteases essenciais no ciclo de vida de parasitas como por exemplo às proteases das espécies de Plasmodium, Entamoebas, Onchoceras, Leishmanias, Haemonchus, Dictyostelium, Therilerium, Esquistossomas, Tripanossomas (T. cruzi, esta enzima é também conhecida como cruzaina ou cruzipaina).

Em realização ainda mais particular as cisteíno-proteases inibidas pelos compostos da presente invenção são Catepsinas B, Cruzaina e Enzima Conversora de Interleucina-1 β .

Em realização mais particular da presente invenção as serino-peptidases inibidas pelos compostos aqui revelados são dipeptidil-peptidase IV, acilaminacil-peptidase, oligopeptidase B além da prolil-oligopeptidase.

Em realização mais particular da presente invenção a metalo-protease inibida pelos compostos aqui revelados é Enzima Conversora de Angiotensina (ACE). As quatro classes de Metalo-proteases de matriz (MMPs),

28/

a saber, Colagenases, Estromelisinases, Metaloprotease tipo membrana e Genatinases podem ser inibidas por estes compostos. Assim sendo, os compostos apresentados poderão então ser eficazes no tratamento de doenças inflamatórias do Sistema Nervoso Central que acarretam degradação da Mielina, incluindo a Esclerose Múltipla e Encefalomielite autoimune (Cuzner ML, Opdenakker G; Journal of Neuroimmunology; 94, 1-14, 1999).

Em outra realização particular a endopeptidase inibida pelos compostos aqui revelados é a Catepsina D. A Encefalinase ou Endopeptidase 24.11 também sofrem inibição pelos compostos descritos. Dessa forma os mesmos têm aplicação em doenças cardíacas que envolvam a degradação do fator natriurético atrial (ANF). Varin J, Duboc D, Weber S, Fouchard J, Schwartz JC, Muffatjoly M, Guerin F; Archives Des Maladies Du Coeur Et Des Vaisseaux; 84, 1465-1471, 1991.

Em realização particular as doenças tratáveis com os compostos da presente invenção compreendem: doenças causadas por degradação de tecidos como por exemplo artrites, distrofia muscular, invasão tumoral, glomeronefrites, infecções ósseas por parasitas, parasitomas, doenças periodontais e metástase tumoral entre outras; doenças cardíacas que envolvam a degradação do fator natriurético atrial; doenças inflamatórias como por exemplo bronquites, artrites reumatóides, osteoporose, pancreatite aguda e progressões do câncer; distúrbios como a amnésia, controle da depressão e pressão sanguínea; diabetes, tripanossomias, doença de Chagas, distúrbios alimentares, bulimia nervosa e anorexia; alcoolismo, doenças relacionadas à produção de citocinas e receptores de citocinas tais como, interleucina-6 (IL-6), fator alfa de necrose tumoral (TNF-alpha), interferon-gama (INFN-gamma), receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA), IL-10, e fator estimulante de crescimento de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), stress psicológico; combate das infecções causadas pelo vírus HIV (Aids); doenças inflamatórias do

Sistema Nervoso Central que acarretam degradação da Mielina, incluindo a Esclerose Múltipla e Encefalomielite autoimune. Além de estarem envolvidos na inibição da ACE que, por sua vez, está relacionada com a modulação do sistema imunológico, regulação proliferação de células progenitoras do Sistema Hematopoiético e inibição significativa do ciclo de células jovens; hipertensão sem mielosupressão. À ação dos compostos ciclopalladados revelados pela presente invenção também se deve a inibição do crescimento invasivo de tumores como câncer de mama, medulares, adenomas, tireóide, melanoma, gástrico, intestinal, esôfago, e tumores tireoideanos. No caso de câncer da tireóide, quando empregados juntamente com radioterapia, os mesmos impedem efeitos colaterais indesejáveis, como por exemplo, a leucemia. Encontram aplicação também no combate a neuroblastomas. Os compostos ciclopalladados descritos apresentam propriedades antiangiogênicas e antimetastáticas, no que concerne ao tratamento dos tumores malignos.



Atuando sobre essas enzimas e participando de interações com moléculas de DNA, esses compostos modulam o sistema imunológico, constituindo-se assim, não só em eficazes agentes antitumorais, principalmente no combate a tumores malignos, mas também como substâncias ativas em outras doenças associadas à degradação de tecidos, doenças desencadeadas por processos inflamatórios e/ou por origem viral, bacteriana ou por parasitas, doenças autoimunes, diabetes, amnésia, distúrbios nervosos e alimentares, estresse, alcoolismo e hipertensão entre outros. Além da alta eficácia como imunomoduladores e imunossuppressores, as drogas da presente invenção podem agir a baixas concentrações, com baixa citotoxicidade, apresentando no caso específico no tratamento do câncer propriedades antiangiogênicas e antimetastáticas.

SÍNTESE

Os complexos de paládio de acordo com a presente invenção

contendo o grupo Azida (N_3^-), foram sintetizados com o intuito deste grupo constituir-se em uma "sonda espectroscópica" na região do infravermelho, para uma caracterização estrutural mais precisa sobre o caráter iônico ou molecular dos complexos, bem como de sua natureza mono- ou binuclear. Este grupo possui modos normais de vibração no IV nas regiões de 2040-2060 cm^{-1} (estiramento assimétrico) e 1400-1500 cm^{-1} (estiramento simétrico), que possibilitam estas atribuições. Embora esses complexos também tenham apresentado efeitos biológicos como antitumorais e como inibidores de enzimas, os mesmos não se constituem nos compostos mais indicados no seu emprego como fármacos pois apresentam efeitos citotóxicos e efeitos colaterais indesejáveis, afetando o ciclo de respiração celular. Para todos os complexos sintetizados contendo o grupo azida, foram obtidos os análogos com o íon cloreto (Cl^-), que não apresentam esses efeitos secundários e constituem-se em drogas igualmente ativas.

30p

A síntese dos compostos foi realizada à temperatura ambiente usando reagentes de alto grau de pureza de fornecedores comerciais sem purificação adicional. Análises elementares foram realizadas pela Central Analítica IQ-USP-SP-Brasil. Os espectros FT-IR foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer *Spectrum-One* na faixa de 4000-400 cm^{-1} com amostras na forma de pastilhas de KBr. Os espectros de RMN de 1H e $^{31}P\{^1H\}$ foram obtidos em um espectrômetro multinuclear Bruker Avance *DPX-300*, a 300 e 81 MHz, respectivamente. Os dados sobre RMN de próton foram registrados em ppm, utilizando-se TMS a 0.00 ppm como referência. Os deslocamentos químicos de $^{31}P\{^1H\}$ foram medidos em relação ao H_3PO_4 . Todas as medidas de RMN foram obtidas no solvente $CDCl_3$. Medidas de condutividade molar dos complexos foram realizadas em um condutivímetro *Metrohm mod.712* usando-se nitrometano como solvente. Os complexos de partida estão ilustrados pelo Exemplo 1. Realizações particulares da presente

invenção podem ser verificadas na preparação de complexos de partida e demais exemplos.

PREPARO DE COMPLEXOS COM LIGANTES BIFOSFÍNICOS

A partir dos complexos de partida descritos no Exemplo 1
5 inúmeros complexos ciclopaladados foram sintetizados, segundo realizações
particulares da presente invenção, por reações com 1,1'-bis-difenilfosfina-
ferroceno, (**dppf**). O produto resultante depende da estequiometria e solvente
usado. Complexos moleculares e iônicos foram isolados tendo 1 ou 2 centros
metálicos e contendo o ligante de coordenação bifosfínico na forma mono ou
10 bidentada para o íon paládio (II).

PROCEDIMENTO GERAL

Compostos iônicos apresentando ligantes bifosfínicos quelados
do tipo $[Pd(C^2,N\text{-}dmpa)(L)]X$ (L = ligante bidentado) foram sintetizados a partir
de reações dos complexos ciclopaladados de partida com ligantes bifosfínicos
15 ($L\text{-}L$). Uma razão molar 2:1 entre o ligante bifosfínico e o respectivo complexo
de paládio foi usada. Assim, 0.2 mmol do composto ciclopaladado dimérico
foram parcialmente dissolvidos em 50 ml de acetona em um erlenmeyer. Então,
0.4 mmol de ($L\text{-}L$) foi adicionado à suspensão resultante. A mistura ficou sobre
agitação constante à temperatura ambiente por 1 hora. O solvente da mistura
20 final foi evaporado sob pressão quase secra e o sólido resultante foi então
precipitado com a adição de hexano. O sólido foi posteriormente lavado com
 Et_2O e seco a vácuo.

Compostos moleculares apresentando ligantes bifosfínicos
monodentados do tipo $[Pd(C^2,N\text{-}dmpa)(L)X]$. (L =ligante monodentado) foram
25 sintetizados por procedimento similar usando diclorometano como solvente.

Complexos ciclopaladados dinucleares apresentando ligantes
bifosfínicos em ponte do tipo $[Pd_2(C^2,N\text{-}dmpa)_2(\mu\text{-}L)X_2]$ (L =ligante bifosfínico
em ponte) foram obtidos usando-se uma razão molar de 1:1 entre o ligante

31

bifosfínico e o respectivo complexo de paládio com diclorometano como solvente. Estas referidas realizações preferenciais da presente invenção são ilustradas pelos exemplos 2 a 4.

32p

INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM ENZIMAS

5 A Catepsina B e papaína foram fornecidas pela empresa Calbiochem Co. e a concentração das enzimas ativas, determinadas por titulação usando-se o inibidor de cisteino-proteases conhecido por E-64. Catepsina B e papaína foram acondicionadas a 4°C em 50 mM em tampão acetato de sódio (pH 5.0) contendo 10 µM MMTS. O substrato fluorogênico
10 amidometilcoumaril *Z-Phe-Arg-MCA*, tripsina e o inibidor irreversível de papaína E-64 foram fornecidos pela Sigma.

A influência dos compostos organometálicos sobre a atividade da endopeptidase catepsina B foi determinada por espectrofluorimetria usando o substrato fluorogênico *Z-Phe-Arg-MCA*. Esse peptídeo é um bom substrato
15 para catepsina B com $k_{cat}/K_s = 4.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, e foi escolhido a fim de posicionar resíduos Phe e Arg em P₂ e P₁ respectivamente. O substrato cobre os principais sítios de ligação S₂, S₁ e S'₁ com cisteino-proteases similares à papaína (Turk,D;et al., "Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases". *J. Biol. Chem.*; **1998**, 379, 137-147).

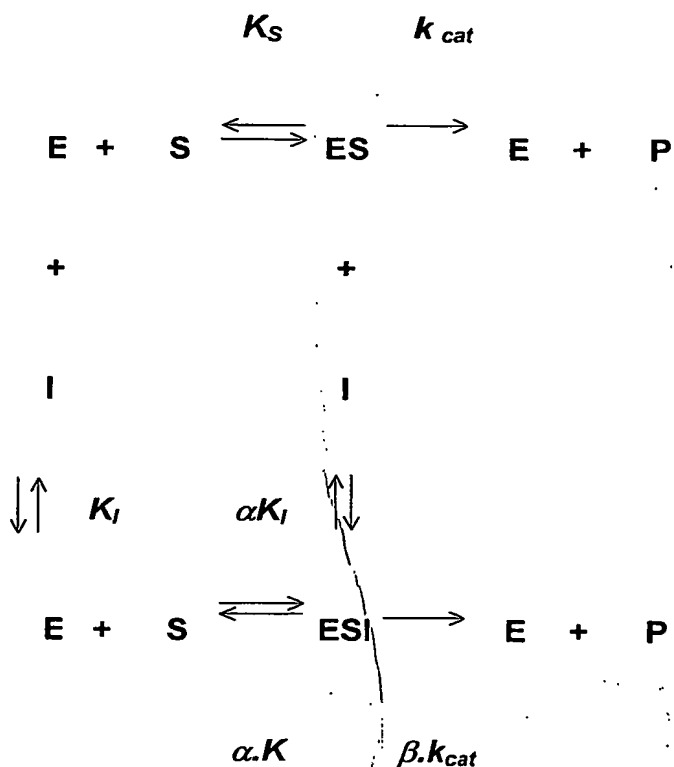
20 As intensidades dos sinais de fluorescência foram monitoradas por um espectrofluorímetro termostático Hitachi F-2000. O comprimento de onda foi calibrado a 380 nm para a excitação e 440 nm para a emissão. A ativação da enzima se deu por incubação por 5 min a 37°C em solução tampão 50 mM de fosfato de sódio (pH 6.4) contendo NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, e
25 DTT 2 mM. As medidas foram realizadas no mesmo tampão de ativação da catepsina B e parâmetros cinéticos determinados pela tomada da taxa inicial de hidrólise em várias concentrações do substrato na presença ou ausência de diferentes concentrações de compostos organometálicos. Os resultados foram

analisados por regressão não-linear pelo uso do programa GraFit 3.01 (Erithacus Software Ltd.),

O modelo cinético do Esquema 1 descreve o efeito da heparina sobre a hidrólise de Z-Phe-Arg-MCA pela catepsina B:

33p

5

ESQUEMA 1

Onde S representa o substrato Z-Phe-Arg-MCA; I representa o composto ciclometalado; E a catepsina B; K_S a constante de dissociação do substrato; K_I a constante da aparente dissociação do organometálico; α um parâmetro de perturbação de K_S ; e β um parâmetro de perturbação de V_{max} (k_{cat}), estando os parâmetros de acordo com a equação:

10

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_S \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{\left(1 + \frac{\beta \cdot [I]}{\alpha \cdot K_I}\right)} + [S] \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha \cdot K_I}\right)}{\left(1 + \frac{\beta \cdot [I]}{\alpha \cdot K_I}\right)}}$$

Estudos cinéticos foram realizados para o complexo ciclopaladado [Pd (C²,N-(R⁺ dmpa)(dppf)N₃]. Como mostra a Figura 1A a presença do organometálico no teste cinético da Catepsina B resulta em diminuição dos valores k_{cat} para a hidrólise de *Z-Phe-Arg-MCA*. Por outro lado, a Figura 1B mostra que o composto também aumenta marcadamente a afinidade da Catepsina B pelo substrato *Z-Phe-Arg-MCA*. O efeito do organometálico sobre a atividade da endopeptidase Catepsina B pode ser descrita por meio de uma curva do tipo hiperbólica mista com padrão de inibição mostrado no Esquema 1. A eficiência do sistema de hidrólise do substrato pode ser alterada através de mudanças no K_S (parâmetro α) ou V_{max} (parâmetro β). Os dados foram tratados de acordo com a Equação 1 usando-se regressão não-linear e os valores para as constantes foram determinados. Os resultados mostram que [Pd (C²,N-(R⁺ dmpa)(dppf)N₃] se liga a Catepsina B livre (E) com constante de dissociação $K_H = 12 \pm 1 \mu\text{M}$, e o composto se liga ao complexo enzima-substrato (ES) com constante de dissociação $\alpha K_H = 2.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$. O complexo ainda induziu aumento de 5.3 vezes na afinidade da Catepsina B pelo substrato *Z-Phe-Arg-MCA*; o valor de K_S diminuiu de 110 ± 15 para $21 \pm 2 \mu\text{M}$ na presença do composto organometálico, $\alpha = 0.19 \pm 0.02$ (Fig. 1B), enquanto o valor de k_{cat} na presença de [Pd (C²,N-(R⁺ dmpa)(dppf)N₃] também diminuiu 5.6 vezes, $\beta = 0.18 \pm 0.02$. O composto ciclopaladado diminuiu a constante de formação do produto para 36 ($\beta = 0.18 \pm 0.02$) na mesma proporção que aumentou a afinidade da Catepsina B pelo substrato *Z-Phe-Arg-MCA* ($\alpha = 0.19 \pm 0.02$), i.e., $\alpha = \beta$. Apesar da Catepsina B ter sido fortemente inibida pelo complexo organometálico (81 % de inibição), sua eficiência para esse substrato na presença do complexo organometálico não se alterou, $\beta/\alpha = 1.1 \pm 0.1$. A taxa de hidrólise dos substratos de segunda ordem foi à mesma, $k_{cat}/K_S = 4.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, na presença ou ausência de [Pd (C²,N-(R⁺ dmpa)(dppf)N₃].

Catepsina B e outras cisteíno-proteases pertencentes a

34

35p

superfamília da papaína, contém estrutura de dobras altamente conservada (Turk, V.; Bode, W. Lysosomal cysteine proteinases and their inhibitors cystatins. *Innovations in proteases and their Inhibitors*. Aviles FX (Ed.), Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1993). Estas enzimas se ligam a substratos peptídicos e usam o par de íons tiolato-imidazólio para atuar em sua atividade proteolítica. Esta associação do resíduo de cisteína com a histidina confere ao sítio ativo da cisteína alta nucleofilicidade (Michaud, S.; Gour, B.J. Cathepsin B inhibitors as potential anti-metastatic agents. *Exp. Opin. Patents*, 1998, 8, 645-672). Quebra de ligações amida do substrato envolve a formação de uma acil-enzima intermediária. Depois da formação do complexo não-covalente de Michaelis, o sítio ativo tiolato ataca a ligação do peptídeo para formar um oxianion que é estabilizado no assim chamado "canal do oxianion" por um resíduo de glutamina. O colapso do intermediário tetraédrico resulta na acil-enzima e libera produto. Logo após, a hidrólise da acil-enzima regenera o par iônico catalítico e libera o novo produto, ou seja, ácido carboxílico. O exemplo 5 ilustra ensaios de inibição enzimática por meio dos compostos segundo a presente invenção.

Os resultados corroboram a assertiva referente à ação dos compostos da presente invenção principalmente no complexo Enzima-Substrato de modo reversível.

INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM DNA

(INTERCALAÇÃO)

Estudos por técnica de Dicroísmo Circular (Figura 2) mostram mudanças estruturais provocadas pelos ciclopalladados em moléculas de DNA, dependentes de tempo e concentração das drogas. Isto indica que os mesmos estão envolvidos em processos de apoptose e controle do ciclo celular.

EFEITOS ANTITUMORAIS

Os compostos da presente invenção foram testados em modelos *in vivo*, utilizando-se ratos como cobaias e o carcinoma mamário de Walker-

256 "Tumor de Walker", como modelo de tumor sólido, invasivo e metastático, sobre o qual os compostos mostraram-se muito ativos. O Exemplo 6 e as Figuras 3, 4 e 5 ilustram os experimentos e os resultados obtidos.

36f

Observou-se que os compostos, além de inibirem o desenvolvimento tumoral, em 90% dos casos conseguem reverter o crescimento tumoral. Para o tumor de Walker mencionado, o composto apresentou no modelo *in vivo* uma citotoxicidade seletiva para células tumorais, não havendo sinais crônicos de inflamação quando a droga foi aplicada em tecidos normais. Outra ação importante foi o efeito inibitório sobre a proliferação de células endoteliais em cultura, evidenciando importante ação antiangiogênica. Os compostos apresentaram também no modelo *in vivo* uma grande ação inibitória sobre a Catepsina-B e sobre a Catepsina D, mostrando-se um efetivo agente antimetastático, prevenindo a metástase do tumor no músculo esquelético.

Destaca-se o fato de não ser observado nenhum efeito colateral em nenhuma das cobaias, por qualquer tratamento, revelando uma alta especificidade da droga. As figuras 3, 4 e 5 a seguir ilustram alguns resultados obtidos.

EFEITOS SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO

TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE)

Com o intuito de observar uma possível proteção dos animais tratados com os compostos segundo a presente invenção foi realizada uma curva de sobrevida considerando animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados ou não.

Utilizou-se a Curva de Sobrevida de Kaplan-Meier para análise da probabilidade de sobrevivência. A comparação entre os dois grupos (portadores de tumor x portadores de tumor/tratados) foi realizada pelo método de Log-Rank – procedimentos não paramétricos (Cox-Mantel). A análise de

variância ANOVA foi utilizada quando da análise dos vários grupos. No caso de diferença significativa, o teste de Tukey foi aplicado. Nos casos onde o número de amostra entre dois grupos foi pequeno o teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado.

37h

- 5 Os testes ilustrados pelo Exemplo 7 e Figura 6, mostram que o tratamento dos animais com compostos segundo a presente invenção resultou no aumento da sobrevivência de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich, indicando que estas drogas interferem na progressão tumoral.

TOXICIDADE

10 **CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOIÉTICOS A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS (CFU-C)**

- Quando foi avaliado o número de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais tratados por 4 dias consecutivos com o composto ciclopaladado contendo o
- 15 ligante 1,1'-bis-difenilfosfina-ferroceno, em estruturas 1:2, conforme esquema C (estruturas genéricas), procedimento este, ilustrado pelo Exemplo 8, verificou-se a ausência de mielotoxicidade na dose de 1 mg/kg, uma vez que não houve diferença significativa no número de precursores hematopoiéticos para granulócitos/macrófagos (CFU-GM) em animais tratados quando comparado ao
- 20 grupo controle, evidenciando a ausência de toxicidade medular nesta dose. Resultados similares foram observados com esta mesma dose nos estudos *in vitro* (incubação das células de animais normais com o composto em questão). Por outro lado, doses superiores a 5 mg/L causaram uma diminuição no número de CFU-GM dose-dependente, indicando que os efeitos deste
- 25 composto sobre a medula óssea são dose-dependentes.

FORMAÇÃO DO ESTROMA MEDULAR NO SISTEMA DE CULTURA LÍQUIDA DE LONGA DURAÇÃO

Ao se avaliar os efeitos do composto ciclopaladado contendo o

ligante 1,1'-bis-difenilfosfina-ferroceno em estruturas 1:2, conforme esquema C (estruturas genéricas) no sistema de cultura líquida de longa duração, conforme procedimento ilustrado pelo exemplo 9, o qual permite avaliar os efeitos deste composto sobre a formação do estroma medular, foi verificado

5 que a exposição prolongada destas células a este composto diminui tanto o número de células não aderentes do sobrenadante das culturas líquidas (Figura 7), assim como o número de colônias de células obtido a partir do sobrenadante destas culturas (Figura 8). Por outro lado, houve um aumento significativo no número de células aderentes do estroma medular na presença

10 do ciclopaladado quando comparado ao controle (Figura 9). Este padrão de resposta tem sido observado com drogas inibidoras da enzima conversora da angiotensina (ECA), como o captopril, que atua impedindo que as células pluripotentes (stem cell) da medula óssea entrem para o ciclo celular. Desta forma, a interrupção temporária do ciclo celular pode estar associada a uma

15 maior proteção às células da medula óssea dos efeitos mielotóxicos da quimioterapia.

Mediante o fato do composto ciclopaladado contendo o ligante 1,1'-bis-difenilfosfina-ferroceno em estruturas 1:2, conforme esquema C (estruturas genéricas) ser um inibidor da ECA, e diante dos resultados

20 referentes à formação do estroma medular no sistema de cultura líquida de longa duração, como o aumento de células aderentes associado a uma diminuição de colônias de células progenitoras CFU-GM, indicando a capacidade desta droga, mesmo em baixas concentrações (1 mg/kg), de impedir que células jovens da medula óssea entrem para o ciclo celular.

25 Estes resultados também mostram que os compostos de acordo com a presente invenção são imunomoduladores, pois a diminuição reversível da proliferação de células da medula óssea (granulócitos e macrófagos) está associada a uma menor atividade fagocítica e diminuição na liberação de

38p

interleucina-1 pelos macrófagos com conseqüente diminuição na estimulação de linfócitos, os quais estão envolvidos na progressão das doenças auto-imunes. Portanto, os compostos da presente invenção também podem ser úteis como imunossuppressores.

39

5 Outro aspecto verificado nos resultados foi à presença de muitas colônias no estroma medular com características eritróides, indicando uma atividade estimulatória destes compostos sobre a série eritróide, que seria devida a presença do ferro, o qual pode interfere no metabolismo celular.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

10 A concentração dos compostos ciclopaladados de acordo com a presente invenção utilizada neste estudo está sendo determinada a partir da realização do teste de dose fixa, onde a substância a ser testada é administrada aos camundongos numa dose específica, a qual é selecionada a partir de doses previamente fixadas, de acordo com classificações de
15 instituições regulamentadoras, onde a concentração máxima a ser testada não deve ultrapassar 2000 mg/Kg. A vantagem da utilização do teste de dose fixa em relação ao teste de DL_{50} , é que no teste de dose fixa, o parâmetro avaliado não precisa ser necessariamente a morte do animal, minimizando assim o sofrimento e número de animais utilizado em cada experimento (Barros &
20 Davino, 1996).

Após a administração da droga, segue-se um período de 14 dias de observação. A dose na qual observam-se sinais de toxicidade aguda como alterações de pelo, mucosa e pele, assim como a presença de diarreia e convulsões, conjuntivite, agitação ou lentidão de movimentos é usada para
25 graduar ou classificar o material testado.

Os resultados obtidos de acordo com protocolo ilustrado no Exemplo 10 demonstraram ausência de toxicidade aguda para os compostos ciclopaladados formados pelo enantiômero S(-) da dmpa com o ligante dppf em

proporções 1:1 ou 1:2 conforme estruturas A, B e C (estruturas genéricas) com doses de até 500 e 200 mg/kg, respectivamente, indicando um baixo potencial toxicológico e conseqüentemente menor incidência de efeitos colaterais. Tal resultado é particularmente interessante uma vez que a toxicidade sistêmica das drogas disponíveis no mercado muitas vezes leva o indivíduo a óbito no início do tratamento quimioterápico.

CITOTOXICIDADE IN VITRO EM LINHAGENS LEUCÊMICAS HL-60 E K-562 E EXPRESSÃO DO PROTO-ONCOGENE BCL-2:

A avaliação da citotoxicidade através do método de redução do MTT-tetrazolium [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)] que permite a avaliação tanto da proliferação como da citotoxicidade celulares através de um sistema de oxirredução mitocondrial foi utilizado. Desta forma, o tetrazolium é reduzido através das células viáveis, formando o sal de Formazan, o qual deverá ser solubilizado (Mossmann, 1983) para leitura da absorbância através de ELISA a 560 nm.

Através dos resultados obtidos por experimentos conforme ilustrado no Exemplo 11, verificou-se uma atividade citotóxica dos compostos ciclopaladados em ambas linhagens estudadas, sendo que os resultados obtidos com os dois compostos foram similares (Figuras 10 e 11). Resultados mostram que estas drogas são antileucêmicas, uma vez que estas linhagens representam células com grande capacidade de resistência aos quimioterápicos existentes atualmente no mercado. Além disso, um dos compostos avaliados, o ciclopaladado formado pelo enantiômero S(-) da dmpa e o ligante dppf em proporções 1:2, conforme a estrutura A (estruturas genéricas), foi capaz de diminuir a expressão da proteína oncogene bcl-2 em células leucêmicas HL60 com doses de 12,5 ug/ml, indicando que esta droga induz as células leucêmicas ao processo de apoptose, uma vez que a elevada expressão de bcl-2 interfere no processo de resposta a quimioterapia através

de interferências no processo de morte celular programada ou apoptose. Ao se avaliar o aspecto morfológico das células tratadas com compostos contendo azida, foi verificado um grande numero de células com características de necrose (membrana rompida e presença de fragmentos celulares na lâminas), indicando que compostos com azida interferem no metabolismo oxidativo, o que é condizente com os resultados obtidos no estudo da toxicidade aguda. Por outro lado, o aspecto morfológico das células leucêmicas HL60 tratadas com compostos ciclopaladados, é o de células em processo de morte celular programada ou apoptose, conforme ilustrado na Figura 12.

TESTES BIOLÓGICOS REALIZADOS COM O MELANOMA

Foram realizados ensaios biológicos *in vitro* para a verificação do efeito citotóxico dos ciclopaladados sobre células de melanoma murino B16F10-Nex2, que foram incubadas por 24 horas com a droga. Também foram realizados ensaios *in vivo* em camundongos fêmeas C57Bl/6., onde foram implantadas 10^5 células tumorais subcutaneamente. Após a implantação tumoral, iniciou se o tratamento, aplicando-se 3 vezes por semana, uma concentração de $10\mu\text{M}$ dos ciclopaladados por via intraperitoneal.

Os resultados são apresentados no Exemplo 12 e Figuras 13, 14, 15 e 16.

TESTES REALIZADOS EM CULTURA DE CÉLULAS

TUMOR DA TIREÓIDE

Foram realizados ensaios em culturas de células de tumores tireoideanos das linhagens WRO, NPA e ARO. Os compostos moleculares do tipo $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}-(\text{S}_{(-)}\text{dmpa})(\text{L})\text{X})]$ apresentaram doses inibitórias (IC_{50}) de $0,48\mu\text{g}$ para a linhagem WRO, $0,59\mu\text{g}$ para a linhagem NPA e $0,60\mu\text{g}$ para a linhagem ARO. Os compostos $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N}-(\text{S}_{(-)}\text{dmpa})_2(\mu-\text{L})\text{X}_2)]$ apresentaram doses inibitórias (IC_{50}) da mesma ordem. Para os ciclopaladados análogos formados pelo enantiômero R(+) da dmpa foram obtidas as seguintes doses

inibitórias (IC_{50}) 5,56 μg para a linhagem WRO, 6,04 μg para a linhagem NPA e 7,57 μg para a linhagem ARO. Novamente foi observado que para os compostos do tipo $[Pd_2(C^2,N-(R_{(+)}dmpa)_2(\mu-L)X_2]$ essas doses inibitórias não se alteraram significativamente. Pelos resultados apresentados evidenciou-se
5 que para o enantiômero R(+) as doses inibitórias IC_{50} são cerca de 10 vezes superiores, quando comparadas àquelas observadas para o enantiômero S(-). Este fato demonstra uma dependência enantioseletiva do processo de citotoxicidade provocado pelos compostos, mostrando uma maior eficiência dos compostos que possuem em sua estrutura o isômero S(-) da dmpa.

10 Os resultados apresentados indicam que tais compostos podem ser utilizados com sucesso na terapia do câncer tireoideano. Esses tumores são dos que mais expressam a catepsina-D e também contra os quais até o momento não se tem um quimioterápico específico e eficiente. A eficácia dos complexos de paládio da presente invenção a tal enfermidade toma ainda mais
15 vulto quando considerado que esses complexos também modulam o sistema imunológico, conforme ficou comprovado. Isto significa que, além de serem uma esperança no tratamento destes tumores, os compostos ciclopaladados aqui apresentados poderão servir de coadjuvantes importantes em tratamentos de radioterapia, impedindo muitos dos indesejáveis efeitos colaterais, como por
20 exemplo a leucemia, a queda de cabelos e a destruição de células do sistema nervoso central.

Os compostos ciclopaladados de acordo com a presente invenção, particularmente compostos ciclopaladados dos enantiômeros R(+) e S(-) da N,N-dimetil-1-fenetilamina (dmpa) e ligante 1,1'-bis-difenilfosfina-ferroceno (dppf), apresentam potencial antitumoral bastante significativo,
25 particularmente em linhagens leucêmicas e algumas linhagens de melanoma, podendo levar as células ao processo de apoptose celular.

Os compostos da invenção apresentam um baixo potencial

42h

toxicológico e conseqüentemente menor incidência de efeitos colaterais e, ao contrário da maioria dos quimioterápicos, os quais são mielotóxicos, foi verificada com os compostos da presente invenção ausência de sinais de mielotoxicidade. Os resultados mostram os efeitos destas drogas sobre a hematopoiese e que este é dose-dependente, sendo que em doses baixas os ciclopaladados são menos tóxicos para as células normais em relação aos quimioterápicos convencionais.

Ao se avaliar os efeitos desta mesma droga no sistema de cultura líquida de longa duração foi verificado padrão de resposta que tem sido observado com drogas inibidoras da enzima conversora da angiotensina (ECA), que resultam na interrupção temporária do ciclo celular que está associada a uma maior proteção às células da medula óssea, dos efeitos mielotóxicos da quimioterapia convencional.

Estes resultados também demonstram a atividade dos compostos da presente invenção como imunomoduladores e imunossuppressores.

Nestes mesmos ensaios, verificamos que muitas colônias do estroma medular apresentavam características da série eritróide, indicando uma possível atividade estimuladora sobre a série eritróide.

DOSAGEM E FORMULAÇÃO

Para os fins da presente invenção o paciente pode ser animal ou humano, particularmente humano.

Os compostos ciclopaladados de acordo com a presente invenção e composições compreendendo pelo menos um composto segundo a presente invenção podem ser administrados oralmente, por meio injetável, particularmente por aplicação intraperitoneal, através da utilização de qualquer forma de dosagem farmacêuticamente aceitável conhecida na técnica para essas administrações. Em realização particular, os compostos e composições compreendendo os compostos da presente invenção não são alterados pelo

trato digestivo sendo fornecidos na forma injetável.

O ingrediente ativo pode ser fornecido em formas de dosagem sólidas, tais como pós secos, grânulos, pastilhas ou cápsulas, ou em formas de dosagem líquidas, tais como xaropes ou suspensões aquosas. A administração dos compostos segundo a presente invenção pode se dar por exemplo, mas não limitado á, por meio oral, subcutâneo, intravenoso, intranasal, transdermal, intraperitoneal, localizado, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, retal, intraocular ou sublingual. Em alguns casos os compostos podem ser aplicados de forma tópica como por spray ou solução.

O ingrediente ativo pode ser administrado isoladamente, mas é geralmente administrado com um veículo farmacêutico. Um objeto da presente invenção compreende as composições farmacêuticas das quais faz parte pelo menos um composto ciclopaladado de acordo com o conteúdo aqui revelado. Um exame valioso com relação às formas de dosagem farmacêuticas é apresentado em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing.

Os compostos de acordo com a presente invenção e composições a base dos mesmos podem ser administrados em formas de dosagem oral, tais como pastilhas, cápsulas (cada uma das quais incluindo formulações de liberação programada ou prolongada), pílulas, pós, grânulos, elixires, essências, suspensões, xaropes e emulsões. Da mesma forma, podem também ser administrados de forma intravenosa (mistura ou infusão), intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular, todas utilizando formas de dosagem bem conhecidas dos técnicos em assuntos farmacêuticos. Uma quantidade eficaz, que produz o efeito desejado, mas não tóxica do composto pode ser empregada para evitar ou tratar tumores, principalmente no combate a tumores malignos, doenças associadas à degradação de tecidos, doenças desencadeadas por processos inflamatórios e/ou por origem viral, bacteriana ou por parasitas, doenças auto-imunes, diabetes, amnésia, distúrbios nervosos

e alimentares, estresse, alcoolismo e hipertensão entre outras.

Os regimes de dosagem para os compostos de acordo com a presente invenção naturalmente variarão, dependendo de fatores conhecidos, tais como as características farmacodinâmicas do agente específico e seu modo e via de administração; espécie, idade, sexo, saúde, condições médicas e peso do paciente; natureza e extensão dos sintomas; tipo de tratamento concorrente; frequência de tratamento; via de administração; quadro geral do paciente e efeito desejado. Um médico ou veterinário com conhecimentos comuns pode facilmente determinar e receitar a quantidade eficaz da droga necessária para prevenir, combater ou suspender o progresso da condição.

Os compostos de acordo com a presente invenção podem ser administrados, com vantagens, em uma única dose diária, ou a dosagem total diária pode ser administrada em doses divididas em duas, três, quatro vezes ou mais por dia. Para determinados tratamentos é apropriado, no entanto, aplicação em dias alternados, de forma cíclica ou não.

Os compostos de acordo com a presente invenção podem ser administrados de forma intranasal através da utilização tópica de veículos intranasais apropriados ou através de vias transdérmicas, utilizando as formas de emplastos de pele transdérmicos bem conhecidos dos técnicos no assunto. Para ser administrada na forma de sistema de fornecimento transdérmico, a administração da dosagem será, naturalmente, contínua e não intermitente ao longo do regime de dosagem.

Para administração oral na forma de pastilha ou cápsula, por exemplo, o componente de droga ativa pode ser combinado com um veículo inerte oral, e farmacologicamente aceitável, tal como lactose, amido, sacarose, glicose, metil celulose, estearato de magnésio, fosfato dicálcico, sulfato de cálcio, manitol, sorbitol e similares; para administração oral em formas líquidas, os componentes de drogas orais podem ser combinados com qualquer veículo

45h

inerte oral, e farmacêuticamente aceitável, tal como etanol, glicerol, água e similares. Além disso, quando desejado ou necessário, aglutinantes, lubrificantes, agentes desintegrantes e agentes corantes apropriados também podem ser incorporados à mistura. Os aglutinantes apropriados incluem amido, 5 gelatina, açúcares naturais tais como glicose ou β -lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietileno glicol, ceras e similares. Os lubrificantes utilizados nessas formas de dosagem incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de 10 sódio e similares. Os desintegrantes incluem, sem limitação, amido, metil celulose, agar, bentonita, goma xantana e similares.

Os compostos de acordo com a presente invenção podem também ser administrados na forma de sistemas de fornecimento de lipossomas, tais como pequenas bolhas unilamelares, grandes bolhas 15 unilamelares e bolhas multilamelares. As lipossomas podem ser formados a partir de uma série de fosfolipídios, tais como colesterol, estearilamina ou fosfatidilcolinas.

Os compostos de acordo com a presente invenção podem também ser acoplados a polímeros solúveis como possíveis veículos de 20 drogas. Esses polímeros podem incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, poliidroxi propilmetacrilamidofenol, poliidroxi etil aspartamidofenol ou polietileno-óxido-polilisina substituída com resíduos de palmitoíla. Além disso, os compostos de acordo com a presente invenção podem ser acoplados a uma 25 classe de polímeros biodegradáveis úteis para atingir a liberação controlada de uma droga, tais como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico e ácido poliglicólico, poliepsilon caprolactona, ácido poliidroxi butírico, poliortoésteres, poliacetais, polidiidropiranos, policianoacilatos e copolímeros de bloco reticulados ou anfipáticos de hidrogéis.



As cápsulas de gelatina podem conter o ingrediente ativo e veículos em pó, tais como lactose, amido, derivados de celulose, estearato de magnésio, ácido esteárico e similares. Diluentes similares podem ser utilizados para a fabricação de pastilhas comprimidas. Tanto pastilhas como cápsulas
5 podem ser fabricadas na forma de produtos de liberação prolongada, para proporcionar a liberação contínua de medicação ao longo de várias horas. As pastilhas comprimidas podem ser revestidas com açúcar ou revestidas com filme para mascarar qualquer sabor desagradável e proteger a pastilha da atmosfera, ou revestidas de forma entérica para desintegração seletiva no trato
10 gastrointestinal.

Formas de dosagem líquidas para administração oral podem conter corantes e aromatizantes para aumentar a aceitação do paciente. De forma geral, água, um óleo apropriado, solução salina, dextrose aquosa (glicose), soluções de açúcar relacionadas e glicóis, tais como propileno glicol
15 ou polietileno glicóis, tampão fosfato são veículos apropriados em formas de dosagem líquidas soluções parenterais ou para aplicação intraperitoneal além de DMSO ou qualquer solvente coordenante, grupo que inclui a água.

As soluções para administração parenteral contêm particularmente um sal hidrossolúvel do ingrediente ativo e DMSO, ou outro
20 solvente coordenante, agentes estabilizantes apropriados e substâncias tampão se necessário. Agentes antioxidantes, tais como bissulfito de sódio, "sulfito de sódio ou ácido ascórbico, sejam eles isolados ou combinados, são agentes estabilizantes apropriados. Também são utilizados ácido cítrico e seus sais e EDTA de sódio. Além disso, as soluções parenterais podem conter
25 conservantes, tais como cloreto de benzalcônio, metil propil paraben e clorobutanol.

Composições para aplicação intraperitoneal compreendem particularmente água, solução salina e/ou tampão fosfato pH 7,4 e de 0,1 a

30% de DMSO, mais particularmente de 1 a 10% em peso da composição e agentes estabilizantes ou conservantes se necessário.

Veículos farmacêuticos apropriados são descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, texto de referência padrão neste campo, cujo conteúdo é aqui incorporado.

Pode-se esperar dosagem diária de ingrediente ativo de cerca de 0,0001 a cerca de 500 miligramas por quilograma de peso do corpo, sendo a dose particular de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e mais particularmente de 0,0001 a cerca de 30 mg/kg. A dosagem diária ainda poderá ser calculada em relação a sua concentração final no volume de sangue do paciente sendo fornecida visando se obter 0,01 a 200 μ M, particularmente 0,1 a 50 μ M, mais particularmente de 10 a 25 μ M.

Formas de dosagem de composições apropriadas para administração contêm cerca de 0,0001 a 250 mg, mais particularmente de cerca de 0,1 a 100 mg de ingrediente ativo por unidade. Nessas composições farmacêuticas, o ingrediente ativo estará normalmente presente em quantidade de cerca de 0,001 a 99% em peso, particularmente de cerca de 0,1 a 70% e mais particularmente de cerca de 0,1 a 40% em peso, com base no peso total da composição a qual pode ainda compreender no mínimo um veículo farmacêuticamente aceitável. O ingrediente ativo pode ser administrado oralmente em formas de dosagem sólidas, tais como cápsulas, tabletes e pós, ou em formas de dosagem líquidas, tais como elixires, xaropes, soluções e suspensões. Pode também ser administrado parenteralmente, ou aplicado intraperitonealmente em formas de dosagem líquidas estéreis.

A forma de dosagem farmacêutica preferida de acordo com a presente invenção corresponde a composições líquidas para administração injetável, particularmente intraperitoneal. Pode-se preparar uma formulação parenteral apropriada para administração através de injeção, por exemplo, por

meio de agitação de 1,5% em peso de ingrediente ativo em 10% em volume de DMSO e tampão fosfato pH 7,4. A solução é esterilizada através de técnicas utilizadas normalmente.

49/

Formas de dosagem dos produtos de combinação de acordo com a presente invenção, em que um dos ingredientes ativos possui revestimento entérico, podem apresentar-se na forma de tabletes, de tal forma que o componente com revestimento entérico e o outro ingrediente ativo são misturados juntos e, em seguida, comprimidos em um tablete ou similar, de forma que o componente com revestimento entérico seja comprimido em uma camada de tablete e o outro ingrediente ativo seja comprimido em uma camada adicional. Opcionalmente, a fim de separar adicionalmente as duas camadas, podem estar presentes uma ou mais camadas de placebo, de tal forma que a camada de placebo fique entre as camadas de ingredientes ativos. Além disso, as formas de dosagem de acordo com a presente invenção podem apresentar-se na forma de cápsulas, em que um dos ingredientes ativos é comprimido em um tablete ou na forma de uma série de microtabletes, partículas, grânulos ou não-esféricos, que recebem então revestimento entérico. Esses microtabletes, partículas, grânulos ou não-esféricos com revestimento entérico são então colocados em uma cápsula ou comprimidos em uma cápsula juntamente com uma granulação do outro ingrediente ativo.

Estas e outras formas de minimização do contato entre os componentes de produtos de combinação de acordo com a presente invenção, seja administrados em forma de dosagem única ou administrados em formas separadas mas ao mesmo tempo ou simultaneamente da mesma maneira, serão facilmente aparentes para os técnicos no assunto, com base no presente relatório descritivo.

DEFINIÇÕES

Por "Sistema Hematopoiético" entende-se um sistema relacionado

com a formação de células sanguíneas.

Por "Sistema Imunológico" entende-se um sistema de células de defesa do organismo formado por glóbulos brancos, responsáveis direta e/ou indiretamente pela defesa do organismo contra corpos estranhos de origem química ou biológica, através da produção de anticorpos.

50p

Por "Inibidor de Proteína" entende-se um agente capaz de impedir uma proteína de exercer suas funções biológicas, geralmente por danos causados em sua estrutura secundária e terciária e/ou em seu sítio ativo.

Por "Inibidor Seletivo" entende-se um inibidor capaz de inibir, em um grande universo de moléculas (proteínas por exemplo), apenas uma molécula específica e/ou família que possuam sítios ativos semelhantes.

Por "Ciclo de Células Jovens" entende-se os acontecimentos bioquímicos e estruturais cíclicos que ocorrem durante o crescimento rápido de células tais como em cultura de tecidos. O ciclo é dividido em períodos denominados G_0 , $Hiat_1$ (G_1), síntese (S), $Hiat_2$ (G_2) e Mitose (M). Quando o mesmo se dá por exemplo com um mielomonócito, uma célula jovem da série granulocítica, denomina-se o mesmo por ciclo de células jovens.

Por "Mielosupressão" entende-se a supressão da produção de mielócitos, ou seja, células jovens da série granulocítica, que ocorre normalmente na medula óssea, mas não no sangue circulante (exceto em certas doenças).

Por "Mielotoxicidade" entende-se a ação de um agente capaz de causar toxicidade em células da medula óssea.

Por "Doenças Auto-Imune" entende-se todo o tipo de doença causada quando as células de defesa do sistema imunológico do organismo não reconhecem as próprias células normais dos órgãos e/ou tecidos que o constituem.

Por "Imunosupressor" entende-se todo agente capaz de causar

imunossupressão, ou seja, prevenção ou interferência com o desenvolvimento da resposta imunológica; pode refletir a falta de resposta imunológica (tolerância), pode ser artificialmente induzida por agentes químicos, biológicos ou físicos, ou pode ser provocada por doença.

51f

5 Por "Imunomodulador" entende-se todo agente capaz de provocar a flutuação funcional e morfológica de células do sistema imunológico em resposta a alteração de condições ambientais das células.

Por "Ligante Bifosfinico Quelante" entende-se todo ligante orgânico contendo dois átomos de fósforo com pares eletrônicos livres, que se ligam a um mesmo centro metálico por ligações coordenadas dativas.

10 Por "Intercalação com DNA" entende-se a coordenação de uma molécula química entre um par de bases formador da dupla hélice da molécula de DNA.

15 Por "Análogo do Ligante" entende-se todos os ligantes isoestruturais, isto é, com estrutura geométrica semelhante. Na presente invenção, qualquer elemento do grupo V da tabela periódica dos elementos químicos, ligados nos anéis ciclopentadienil da 1,1'-Bis-difenilfosfina-ferroceno, em substituição ao átomo de fósforo, podendo ser N, As, Sb ou Bi.

20 Por "Volume Total de Sangue do Paciente" entende-se o volume total do sangue circulante no organismo do paciente. Em se tratando de seres humanos este volume varia entre 6 a 8 litros.

25 Como compreenderão os técnicos no assunto, são possíveis numerosas modificações e variações da presente invenção à luz dos ensinamentos acima. Deve-se portanto compreender que, dentro do escopo das reivindicações anexas, a presente invenção pode ser praticada de outras formas além das descritas especificamente no presente.

São apresentados a seguir exemplos meramente expositivos de realizações específicas da invenção, sem criar quaisquer limitações ao seu

escopo que não aquelas contidas nas reivindicações em anexo.

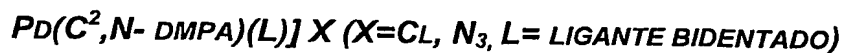
EXEMPLO 1

PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE PARTIDA

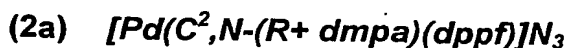
- **$[Pd(C^2,N-dmpa)_2\mu-Cl]_2$** ; **dmpa** = enantiômeros R(+) e S(-) of N,N-dimetil-1-fenetilamina (dmpa) preparado de acordo com Ryabov et al. ("Reactions paths in the cyclopalladated NN-dialkylbenzylamine-substituted styrene system in acetic acid as solvent. The structure of palladated 2-dialkylaminomethylstilbenes". *J. Chem. Soc., Perkin Trans*; **1983**, 2, 1503-1509) e ("Enantioselective cleavage of activated amino acid esters promoted by chiral palladacycles". *Inorg. Chim. Acta*; **1988**, 280, 57-61). Análise % (calcd. $C_{20}H_{28}N_2Cl_2Pd_2$): **a**) R(+): C, 40.4 (40.6); H, 4.8 (4.7); N, 4.8 (4.4). **b**) S(-): C, 40.4 (40.9); H, 4.8 (4.2); N, 4.8 (4.3).
- **$[Pd(C^2,N-dmpa)_2\mu-N_3]_2$** – Esses compostos foram preparados a partir de enantiômeros dímeros R(+) e S(-) de $[Pd(C^2,N-dmpa)_2\mu-Cl]_2$ por meio de reação de troca de íons. A uma solução de $[Pd(C^2,N-dmpa)_2\mu-Cl]_2$ (1.740 g, 3.0 mmol) em THF (100 mL), foi adicionada uma solução de NaN_3 (0.390 g, 6.00 mmol) em metanol (20 mL). O sólido amarelo obtido foi filtrado, lavado com Et_2O e seco a vácuo. Recristalização a partir de tolueno formou produtos microcristalinos (95%R(+); 87% S(-). Análise % (calcd. $C_{20}H_{28}N_8Pd_2$): **a**) R(+): C, 40.6 (40.2); H, 4.7 (4.4); N, 18.9 (18.3). IR: $\nu_{as}N_3$ 2066 cm^{-1} , $\nu_{sim}N_3$ 1447 cm^{-1} . **b**) S(-): C, 40.6 (41.1); H, 4.7 (4.5); N, 18.9 (18.4). IR: $\nu_{as}N_3$ 2058 cm^{-1} , $\nu_{sim}N_3$ 1443 cm^{-1} .

EXEMPLO 2

COMPOSTOS IÔNICOS APRESENTANDO LIGANTES BIFOSFÍNICOS QUELANTES DO TIPO



OBS: Esses compostos aparecem em alguns momentos nos textos descritivos como: Pd R(+) ou S(-) dmpa dppf 1:2 (com N_3 ou Cl).



52h

Análise % (calcd): C, 60.9 (62.1); H, 4.8 (5.0), N, 6.1 (6.6). **¹H-NMR (ppm):**- CH-CH₃* (6H,d,1.55); -N(CH₃)₂ (3 H,s, 2.16); Cp(5H,m,3.99) Cp(5H,m,4.25) - CH*-CH₃ (2H,q,3.99); H-anel aromático (35). **³¹P{¹H}-NMR (ppm):** 2 sinais: 23.0, 32.1. $\Delta M = 44.5 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$.

[Pd(C²,N-(R+ dmpa)(dppf)] Cl (idem).

(2b) [Pd(C²,N-(S- dmpa)(dppf)] N₃.

Análise % (calcd): C, 61.9 (62.1); H, 5.5 (5.0), N, 5.9 (6.6). **¹H-NMR (ppm):**- CH-CH₃* (6H,d,1.55); -N(CH₃)₂ (3 H,s, 2.16); Cp (5H,m,4.21) Cp(5H,m,4.49) - CH*-CH₃ (2H,q,3.97); H-anel aromático (24,m,7.25-7.32). **³¹P{¹H}-NMR (ppm):** 2 sinais: 23.0, 32.1. $\Delta M = 51.1 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$.

[Pd(C²,N-(S- dmpa)(dppf)] Cl (idem).

EXEMPLO 3

COMPOSTOS MOLECULARES APRESENTANDO LIGANTES BIFOSFÍNICOS DO TIPO

[Pd(C²,N- DMPA)(L)X] (X=Cl, N₃, L= LIGANTE MONODENTADOS)

OBS: Esses compostos aparecem em alguns momentos nos textos descritivos como: Pd R(+) ou S(-) dmpa dppf 1:2 (com N₃ ou Cl).

(3a) [Pd(C²,N-(R+ dmpa)(dppf)] N₃

Análise % (calcd): C, 61.3 (62.1); H, 4.9 (5.0), N, 6.1 (6.6). **¹H-NMR (ppm):**- CH-CH₃* (6H,d,1.55); -N(CH₃)₂ (3 H,s, 2.16); Cp(5H,q,3.99) Cp(5H,t,4.25) -CH*-CH₃ (2H,q,3.77); H-anéis aromáticos (24,m,7.25-7.32). **³¹P{¹H}-NMR (ppm):** 2 sinais: 31,9; -16,0. $\Delta M = 15.5 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$.

[Pd(C²,N-(R+ dmpa)(dppf)] Cl (idem).

(3b) [Pd(C²,N-(S- dmpa)(dppf)] N₃

Análise % (calcd): C, 61.9 (62.1); H, 4.5 (5.0), N, 5.9 (6.6). **¹H-NMR (ppm):**- CH-CH₃* (6H,d,1.55); -N(CH₃)₂ (3 H,s, 2.16); Cp (5H,q,3.99) Cp(5H,t,4.25) - CH*-CH₃ (2H,q,3.77); H-anéis aromáticos (24,m,7.25-7.32). **³¹P{¹H}-NMR (ppm):** 2 sinais: 31,9; -16,0. $\Delta M = 13.2 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$

[Pd(C²,N-(S- dmpa)(dppf)] Cl (idem).

53/

EXEMPLO 4

COMPOSTOS MOLECULARES APRESENTANDO LIGANTES BIFOSFÍNICOS DE PONTE DO TIPO $[Pd_2(C^2,N- dmpa)_2(\mu-L)X_2]$ ($X=Cl, N_3, L=$ LIGANTE EM PONTE)

OBS: Esses compostos aparecem em alguns momentos nos textos descritivos como: Pd R(+) ou S(-) dmpa dppf 1:1 (com N_3 ou Cl).

(4a) $[Pd_2(C^2,N- S- dmpa)_2(\mu-dppf)Cl_2]$

Análise % (calcd): C, 56.7 (57.1); H, 5.2 (5.0), N, 2.4 (2.5). **1H -NMR (ppm):** CH-CH₃* (6H,d,2.60); CH-CH₃* (6H,d,2.90); -N(CH₃)₂ (6H, s-br,1.61); -N(CH₃)₂ (6H,s-br,1.63) ; P(CH₂)₂-P (4H,m,2.57-2.85); Cp(2H,sr-br,4.23), Cp(2H,,sr-br,4.57), Cp(3H,m,4.96), Cp(3H,m,5.00, -CH*-CH₃ (2H,q,4.10); H-anéis aromáticos (24,m,6.25-7.57. **$^1P\{^1H\}$ -NMR (ppm):** 1 sinal: 32.7. $\Delta M = 9.3$ S.cm².mol⁻¹.

$[Pd_2(C^2,N- S- dmpa)_2(\mu-dppf)(N_3)_2]$ (idem).

(4b) $[Pd_2(C^2,N-R+ dmpa)_2(\mu-dppf)Cl_2]$

Análise % (calcd): C, 54.3 (57.1); H, 4.9 (5.0), N, 2.3 (2.5). **1H -NMR (ppm):** CH-CH₃* (6H,d,2.60); CH-CH₃* (6H,d,2.90); -N(CH₃)₂ (6H, s-br,1.61); -N(CH₃)₂ (6H,s-br,1.63) ; P(CH₂)₂-P (4H,m,2.57-2.85); Cp(2H,sr-br,4.23), Cp(2H,,sr-br,4.57), Cp(3H,m,4.96), Cp(3H,m,5.00, -CH*-CH₃ (2H,q,4.10); H-anéis aromáticos (24,m,6.25-7.57. **$^{31}P\{^1H\}$ -NMR (ppm):** 1 sinal: 32.7. $\Delta M = 2.4$ S.cm².mol⁻¹.

$[Pd_2(C^2,N-R+ dmpa)_2(\mu-dppf)(N_3)_2]$ (idem).

(4c) $[Pd_2(C^2,N- S- dmpa)_2(\mu-dppf)(N_3)_2]$

Análise % (calcd): C, 55.1 (55.9); H, 4.0 (4.5), N, 9.5 (10.0). **1H -NMR (ppm):** CH-CH₃* (6H,d,2.70); CH-CH₃* (6H,d,3.00); -N(CH₃)₂ (6H, s-br,1.61); -N(CH₃)₂ (6H,s-br,1.65) ; P(CH₂)₂-P (4H,m,2.60-2.90); Cp(2H,sr-br,4.20), Cp(2H,,sr-br,4.61), Cp(3H,m,4.93), Cp(3H,m,5.10, -CH*-CH₃ (2H,q,4.20); H-anéis aromáticos (24,m,6.05-7.77 **$^{31}P\{^1H\}$ -NMR (ppm):** 1 sinal: 32.7. $\Delta M = 7.5$ S.cm².mol⁻¹.

54/

$[Pd_2(C^2,N-S- dmpa)_2(\mu -dppf)Cl_2]$ (*idem*).

(4d) $[Pd_2(C^2,N-R+ dmpa)_2(\mu -dppf)(N_3)_2]$

55

Análise % (calcd): C, 54.8 (55.9); H, 4.1 (4.5), N, 9.7 (10.0). **1H -NMR (ppm):**-
 CH-CH₃* (6H,d,2.70); CH-CH₃* (6H,d,3.00); -N(CH₃)₂ (6H, s-br,1.61); -N(CH₃)₂
 5 (6H,s-br,1.65) ; P(CH₂)₂-P (4H,m,2.60-2.90); Cp(2H,sr-br,4.20), Cp(2H,,sr-
 br,4.61), Cp(3H,m,4.93), Cp(3H,m,5.10, -CH*-CH₃ (2H,q,4.20); H-anéis
 aromáticos (24,m,6.05-7.77 **$^{31}P\{^1H\}$ -NMR (ppm):** 1 sinal: 32.7. $\Delta M = 4.4$
 S.cm².mol⁻¹.

$[Pd_2(C^2,N-R+ dmpa)_2(\mu -dppf)Cl_2]$ (*idem*).

10

EXEMPLO 5

ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA COM A FAMÍLIA DE ENZIMAS SERINO-PEPTIDASES, METALO-PROTEINASES

Estão relacionados a seguir ensaios realizados com os complexos
 de estruturas A, B e C. Esses complexos de paládio são constituídos do anel
 15 ciclometalado formado pelos isômeros R(+) e S(-) da N,N-dimetil-1-fenetilamina
 (dmpa) e pelo ligante 1,1'-Bis-difenilfosfina-ferroceno (dppf). As constantes de
 inibição enzimática foram obtidas por métodos clássicos utilizando-se a técnica
 de espectrofluorimetria e cálculos indiretos. Nos ensaios foram utilizados
 volumes de 1 ml de solução das enzimas, contendo uma massa total
 20 conhecida, que variou de 2 a 5 ng, dependendo do ensaio. Foram
 determinados os seguintes valores de Constantes de Inibição Enzimática,
 listados a seguir:

Serino-peptidase:

Prolil Oligopeptidase (POP), e duas variantes (um mutante da
 25 Cys255The da quarta pá do beta-propeller e o mutante funcional Tyr473Phe).
 Para POPs o tampão usado foi Tris/HCl 20 mM, pH 7,5. O substrato padrão foi
 o Abz-GFSPFRQ-EDDnp (Km 0,38 uM).

(5a)- Complexos com o isômero R(+) da dmpa (em estruturas 1:1)

:1/K_{iapp} = 0,0977 // K_{iapp} = 10,24 ng // K_i = 4,51 ng, para o mutante Cys255The.

:1/K_{iapp} = 0,1234 // K_{iapp} = 8,10 ng // K_i = 3,57 ng, para o mutante Tyr473Phe.

(5b)-Complexos com o isômero R(+) da dmpa (em estruturas 2:1)

:1/K_{iapp} = 8,7242 // K_{iapp} = 0,1146 ng // K_i = 34,01 pg, para o mutante

5 Cys255The.

:1/K_{iapp} = 14,1677 // K_{iapp} = 0,0706 ng // K_i = 20,94 pg, para o mutante Tyr473Phe.

(5c)- Complexos com o isômero S(-) da dmpa (em estruturas 1:1)

:1/K_{iapp} = 6,9164 // K_{iapp} = 0,1496 ng // K_i = 42,90 pg, para o mutante

10 Cys255The.

:1/K_{iapp} = 9,8914 // K_{iapp} = 0,1011 ng // K_i = 30 pg, para o mutante Tyr473Phe.

(5d)-Complexos com o isômero S(-) da dmpa (em estruturas 2:1)

:1/K_{iapp} = 180,3018 // K_{iapp} = 0,004982 ng // K_i = 1,65 pg, para o mutante Cys255The.

15 :1/K_{iapp} = 4,4990 // K_{iapp} = 0,2223 ng // K_i = 65,96 pg, para o mutante Tyr473Phe.

Metalo-protease:

ECA (Enzima conversora de angiotensina)- concentração usada:

0,1-1,0 nM. Tampão utilizado foi o tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 8.0 + 200 mM NaCl. O Substrato padrão foi o Abz-YRK(Dnp)-P-OH (K_m: 7,0 uM).

(5e)- Complexos com o isômero R(+) da dmpa (em estruturas 1:1)

:1/K_{iapp} = 18,7138 // K_{iapp} = 0,05344 ng // K_i = 22,27 pg.

(5f)- Complexos com o isômero R(+) da dmpa (em estruturas 2:1)

:1/K_{iapp} = 1,1578 // K_{iapp} = 0,8637 ng // K_i = 0,36 ng,.

25 **(5g)- Complexos com o isômero S(-) da dmpa (em estruturas 1:1)**

:1/K_{iapp} = 2,0989 // K_{iapp} = 0,4764 ng // K_i = 198,51 pg,

(5h)- Complexos com o isômero S(-) da dmpa (em estruturas 2:1)

:1/K_{iapp} = 3,3136 // K_{iapp} = 0,3018 ng // K_i = 112,28 pg,

56f

Endopeptidase:

CATD (Catepsina D) - concentração usada: 0,05 - 0,5 nM. 57k

Tampão utilizado foi o tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 4,0. O substrato padrão foi o Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (Km 0,17 uM).

5 **(5i)- Complexos com o isômero S(-) da dmpa (em estruturas 1:1)**

:1/ K_{iapp} = 3,3136 // K_{iapp} = 0,3018 ng // K_i = 122,98 pg.

(5j)-Complexos com o isômero S(-) da dmpa (em estruturas 2:1)

:1/ K_{iapp} = 3,5696 // K_{iapp} = 0,2801 ng // K_i = 104,22 pg.

EXEMPLO 6

10

TESTE ANTITUMORAL - TUMOR DE WALKER

Para os teste de ação antitumoral, os compostos foram diluídos tanto em solução aquosa, quanto soro fisiológico, quanto em solução de tampão fosfato de pH=7,4, todas elas contendo 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO). Foram feitas aplicações de quantidades equivalentes dos compostos de forma que sua concentração no volume total de sangue da cobaia (estimado em 30 mL), perfizessem uma concentração da droga de 15 micro-molar no organismo vivo, concentração essa considerada ótima por medidas cinéticas.

Foram feitos experimentos com aplicações intraperitoneais, subcutânea, por aplicação direta na região de implante do tumor e também por 20 implantação do tumor, através de células tumorais, juntamente com os compostos de paládio de acordo com a presente invenção.

Observou-se que em 90% dos casos (total de 60 cobaias), consegue-se reverter o crescimento tumoral. Inoculações de 10^6 células tumorais de forma subcutânea, desenvolve na cobaia em 12 dias tumores sólidos com massa de 4,0 (+/-) 1,0 g. Com a aplicação da droga essa massa é 25 reduzida para 0,3 (+/-) 0,1g. Além de inibirem o desenvolvimento tumoral, os compostos reverteram tumores previamente instalados em 85% dos casos.. Para o tumor de Walker mencionado, o composto apresentou no modelo in-vivo

58 fr

uma citotoxicidade seletiva para células tumorais, não havendo sinais crônicos de inflamação quando a droga foi aplicada em tecidos normais. Foram aplicados nesses estudos injeções de 15 micro-molar/rato x dia, por 10(dez) dias consecutivos. Outra ação importante foi o efeito inibitório sobre a proliferação de células endoteliais em cultura, evidenciando importante ação antiangiogênica. Os compostos apresentaram também no modelo in-vivo uma grande ação inibitória sobre a Catepsina-B e sobre a Catepsina D, mostrando-se um efetivo agente antimetastático, prevenindo a metástase do tumor no músculo esquelético.

Destaca-se o fato de não ser observado nenhum efeito colateral em nenhuma das cobaias, por qualquer tratamento, indicando uma alta especificidade da droga. As figuras 3, 4 e 5 a seguir ilustram alguns resultados obtidos.

EXEMPLO 7

Para o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich, os camundongos são inoculados por via intraperitoneal com 0,1 ml de uma suspensão de células tumorais contendo 10^6 células, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos portadores. Após a retirada do líquido ascítico do peritônio dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich, o número e a viabilidade das células são determinados através da utilização do corante azul-trypan, em câmara de Neubauer.

Com o intuito de observar uma possível proteção dos animais tratados com os compostos $[Pd_2(C^2,N-S-dmpa)_2(\mu-dppf)Cl_2]$ e $[Pd_2(C^2,N-S-dmpa)_2(\mu-dppf)(N_3)_2]$ (conforme esquema C mostrado em estruturas genéricas), foi realizada uma curva de sobrevivência. Foram considerados três grupos experimentais de 12 animais, a saber: animais apenas portadores do tumor ascítico de Ehrlich; portadores do tumor/tratados com 4 doses consecutivas dos compostos ciclopaladados (1 mg/kg) por via subcutânea.

Este experimento foi realizado da seguinte maneira:

59h

Células tumorais de Ehrlich foram removidas da cavidade peritoneal de animais portadores, a seguir, foram diluídas (1:100) em solução de azul de trypan para determinação da viabilidade celular. A concentração foi ajustada em salina para 1×10^6 células/animal. A seguir, 0,2 ml desta solução (contendo 1×10^6 células), foram inoculados nos animais em estudo. Setenta e duas horas após a inoculação tumoral, o tratamento com os ciclopalladados foi iniciado e mantido por 4 dias consecutivos. Os animais foram observados diariamente para controle da mortalidade.

Nos testes *in vivo*, tanto o composto $[Pd(C^2,N-(S-dmpa)(dppf)Cl]$, assim como o $[Pd_2(C^2,N-S-dmpa)_2(\mu-dppf)(N_3)_2]$, na dose de 1 mg/kg aumentaram a sobrevivência de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich, indicando que estas drogas são capazes de interferir na progressão tumoral (figura 6).

EXEMPLO 8

CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOIÉTICOS A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS (CFU-C)

Para enumerar estas células clogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que as condições de cultura sejam ajustadas, para se evitar um número exagerado de colônias em cada placa de Petri com conseqüente superposição das mesmas, de modo a permitir a identificação de cada colônia. Também, é importante que o fator estimulador de crescimento (CFS) seja utilizado em concentrações supra-máximas. Utilizaremos o fator de crescimento hematopoiético recombinante para granulócitos e macrófagos - GM-CSF. Além disso, a escolha do soro bovino fetal deve ser feita cuidadosamente devido a variação encontrada para a atividade dos vários lotes e marcas disponíveis no mercado.

Após sacrificar camundongos normais ou tratados com o composto ciclopaladado formado pelo dmpa e o ligante dppf na proporção de 1:2 (conforme esquema A e B - estruturas genéricas) por via subcutânea durante 4 dias consecutivos, através de deslocamento cervical, limpa-se a pele com álcool iodado. Após exposição do fêmur remove-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e corta-se o osso na junção superior. A medula óssea é transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio de cultura ou solução salina balanceada. O número de células na suspensão é contado em câmara hemacitométrica após diluição 1:10 das células em eosina 10%. Logo após prepara-se o meio mais agar (Bacto-ágar, Difco), o qual consiste de 30% de meio IMDM (Sigam) 2 vezes concentrado, 20% de soro bovino fetal e 50% de agar (0,6%). A seguir, adiciona-se o volume apropriado de células quando o meio mais agar estiver a 37°C. Ressuspendem-se as células e distribuem-se volumes de 1,0 ml em cada placa de Petri, as quais já contém o estímulo apropriado. Nos estudos *in vitro*, foram adicionadas concentrações seriadas do compostos ciclopaladado formado pelo dmpa e o ligante dppf na proporção de 1:2 (conforme esquema A e B - estruturas genéricas). Distribui-se o conteúdo por toda a superfície da placa de Petri e deixa-se gelificar. Incuba-se por 7 dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ no ar e a seguir conta-se o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40x (Metcalf, 1984).

EXEMPLO 9

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DO ESTROMA MEDULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CULTURA LÍQUIDA DE LONGA DURAÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA:

Esta cultura é totalmente dependente da formação de uma camada de células aderentes, derivadas de células estromais da medula óssea. a formação desta camada de células aderentes ocorre através da síntese e secreção de fatores de crescimento hematopoiéticos, os quais são

responsáveis pela formação da matriz extracelular de células estromais. sendo assim, as células mais imaturas permanecem dentro desta camada de células aderentes e são liberadas para o meio de cultura, com o objetivo de manter a hematopoiese. desta forma, o número de células progenitoras no meio de cultura líquida é quantificado após a realização da cultura clonal, na presença de fatores de crescimento hematopoiéticos exógenos (Spooncer et al., 1993).

Após sacrificar os animais (aproximadamente 8), através de deslocamento cervical, os fêmures foram expostos e os ossos na junção superior foram incisados. a medula óssea e as células do estroma medular foram transferidas com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio de cultura rpmi-1640 (sigma) suplementado com 2 mm de l-glutamina, 20 % de soro e cavalo (cult-lab) e 10^{-2} m de hidrocortisona. o volume de células mais meio foi distribuído em frascos de cultura (t25) (10 ml do meio mais células em cada frasco). a seguir, os frascos de cultura foram incubados em estufa úmida com 5% de CO_2 no ar. após 15 dias, uma nova população de células, derivadas da medula óssea de 8 camundongos, foi adicionada nas garrafas de cultura para induzir a proliferação das células progenitoras, uma vez que o estroma medular já estava em início de confluência. realizamos então, após 15 dias da re-população das garrafas de cultura, a cultura clonal (cfu-c) com o objetivo de quantificar o número de precursores hematopoiéticos produzido pelas células aderentes derivadas do estroma medular cultivado *in vitro*. para quantificar o número de células não aderentes e progenitoras, toda semana remove-se 50 % do meio saturado e adiciona-se meio fresco, o qual já deverá conter 1 mg/l do composto ciclopaldado formado pelo dmpa e o ligante dppf na proporção de 1:2 (conforme esquema A e B - estruturas genéricas).

CULTURA CLONAL DOS PRECURSORES HEMATOPOIÉTICOS (CFU-C) A PARTIR DAS CÉLULAS PROGENITORAS OBTIDAS NO MEIO DE CULTURA LÍQUIDA DE LONGA DURAÇÃO

Após obtenção das células não aderentes do sistema de cultura

líquida de longa duração, as mesmas foram lavadas em meio RPMI 1640 (Sigma) e ressuspensas a uma concentração final de 2×10^5 células/ml. A seguir estas células foram submetidas ao protocolo de cultura clonal (CFU-C) conforme descrito no item anterior.

62h

5

EXEMPLO 10

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Os compostos em teste são diluídos em salina contendo 10 % de DMSO e a seguir, 0,2 ml desta solução são administrados aos animais via intraperitoneal. Desta forma, grupos de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) foram tratados com doses variadas dos compostos em estudo. Os animais controle receberam apenas salina com 10 % de DMSO. Após o término do tratamento, os animais ficaram em observação por um período de 14 dias.

Tabela 1

Avaliação da toxicidade aguda de compostos ciclopalladados. Os animais receberam 1 dose dos compostos descritos a seguir por via intraperitoneal e foram observados por um período de 14 dias após este procedimento.

Ciclopalladados	Doses (mg/Kg)	Sinais e sintomas
$S(^-)\text{dmpa } Cl^- \text{ dppf } (1:2)$ $[Pd(C^2, N-(S- \text{dmpa})(\text{dppf})Cl)]$ $[Pd(C^2, N-(S- \text{dmpa})(\text{dppf})]Cl$	50 e 200	Ausência de sinais de toxicidade aguda
$R(^+)\text{dmpa } N_3 \text{ dppf } (1:2)$ $[Pd(C^2, N-(R^+ \text{dmpa})(\text{dppf})N_3]$ $[Pd(C^2, N-(R^+ \text{dmpa})(\text{dppf})]N_3$	10	Sinais de conjuntivite
$R(^+)\text{dmpa } Cl^- \text{ dppf } (1:1)$ $[Pd_2(C^2, N-R^+ \text{dmpa})_2(\mu -\text{dppf})Cl_2]$	10	Sinais de conjuntivite e piloereção.
$S(^-)\text{dmpa } Cl^- \text{ dppf } (1:1)$ $[Pd_2(C^2, N- S- \text{dmpa})_2(\mu -\text{dppf})Cl_2]$	500	Ausência de sinais de toxicidade aguda

Os compostos contendo azida mostraram-se tóxicos na dose de 10 mg/kg, com uma taxa de mortalidade de 10 %, indicando um maior índice de

efeitos colaterais para esta droga.

EXEMPLO 11

CITOTOXICIDADE IN VITRO EM LINHAGENS LEUCÊMICAS HL-60 E K-562 E EXPRESSÃO DO PROTO-ONCOGENE BCL-2:

63p

5 As células das linhagens celulares HL-60 e K-562 mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma), suplementado com 2 mM de L-glutamina e 20 % de soro bovino fetal, foram previamente lavadas (3 vezes) e ressuspensas em meio RPMI. A seguir, foram incubadas com 9 concentrações dos compostos em estudo (160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,65 ug/ml) em placa de cultura de 96 orifício (1×10^6 células/orifício). A seguir, as mesmas foram incubadas em estufa úmida (5 % de CO₂ no ar) por 72 horas. Após este período, a solução de MTT (5 mg/ml) (Sigma) foi adicionada e a placa de cultura incubada por mais 4 horas. Logo após, foi adicionado a solução solubilizante do MTT (ácido isopropílico 0,04N) e após 30 minutos foi efetuada a leitura em ELISA a 15 560 nm em triplicata (Mosmann, 1983). A percentagem de sobrevivência celular na presença dos compostos em estudo foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{Absorbância por orifício (com droga)} \times 100}{\text{Absorbância do controle (sem droga)}}$$

20

EXEMPLO 12

TESTES BIOLÓGICOS REALIZADOS COM O MELANOMA

Ensaio in vitro

Ensaio *in vitro* foram realizados, para a verificação do efeito citotóxico dos ciclopalladados sobre células de melanoma murino B16F10-Nex2. As células foram incubadas por 24 horas em diferentes concentrações. A 25 viabilidade celular foi determinada por ensaio com MTT. Como mostrado na figura 13, observa-se uma eficiência de 100 %, em uma concentração na ordem de 1,25 µM, das drogas contendo a bisfosfina etano (drogas 1,2 e 3). A

mesma eficiência é observada na droga contendo a bis-difenilfosfina-ferroceno, porém em uma concentração maior, a 10 μM (droga 6) e para os ciclopaladados contendo os alcinos funcionalizados (droga 10), na ordem de 20 μM . A figura-13 mostra o efeito citotóxico descrito, onde as percentagens de
5 redução na viabilidade célula, comparativamente a um controle de células sem drogas, estão representadas sobre as barras.

Ensaio *in vivo*

Os ensaios *in vivo* forem realizados em camundongos fêmeas C57B1/6. Foram implantadas 10^5 células tumorais subcutaneamente. Quatro
10 dias após a implantação iniciou-se o tratamento dos animais. Um grupo recebeu 10 μM e outro 30 μM , das drogas mais efetivas, a saber: drogas 1,2,3,6 e 10, por via intraperitoneal, 3 vezes por semana, e nesses dias os volumes tumorais eram quantificados. Os animais foram sacrificados quando o volume tumoral atingia 3000 mm^3 . Nas figuras a seguir estão representadas as
15 curvas de mortalidade dos animais injetados com as drogas e animais controle (A) e em (B) os volumes tumorais dos animais que desenvolveram tumor em cada grupo.

Na figura 14, das drogas administradas à concentração de 10 μM , observa-se em A, uma sobrevida de 10 dias para os animais tratados com as
20 drogas 1, 3, 6 e 10. Em B, observa-se que de todas as drogas, as drogas 1 e 6 foram as que apresentaram um efeito inibitório no desenvolvimento tumoral, de cerca de 60% em relação às outras drogas.

Na figura 15, das drogas administradas à concentração de 30 μM , observa-se em A uma sobrevida de cerca de 7 dias para todas as drogas, sendo que o grupo tratado com a droga 6, obteve um menor número de mortes.
25 Na figura B, observa-se a droga 1 sendo a mais eficiente na inibição do desenvolvimento tumoral. A droga 6, com 18 dias, apresenta um efeito inibitório significativo, porém com 23 dias tem este efeito invertido.

64 R

65h

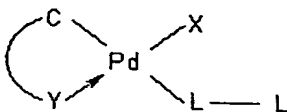
As drogas com os alcinos funcionalizados, também foram testadas *in vitro*, Figura 16, seguindo o mesmo protocolo e apresentaram um efeito citotóxico de 100%, da ordem de 100 μ M. Este efeito está representado na figura a seguir, mostrando ainda que dentre elas, as drogas 11 e 14 apresentam uma inibição significativa, entre 40 e 50%, da ordem de 1 μ M.

A análise dos resultados nos permite algumas correlações importantes a respeito da estrutura química versus atividade da droga. Observa-se uma eficiência de 100 %, em uma concentração na ordem de 1,25 μ M, das drogas contendo a bisfosfina etano (drogas 1,2 e 3). O mesmo não ocorre para os ciclopalladados contendo os alcinos funcionalizados (droga 10), onde é necessária uma concentração da ordem de 20 μ M. De todas as drogas testadas observa-se que as drogas 1 e 6 foram as que apresentaram um efeito inibitório no desenvolvimento tumoral, de cerca de 60% em relação às outras drogas. Observa-se a droga 1 sendo a mais eficiente na inibição do desenvolvimento tumoral, entretanto as cobaias tratadas com a droga 6 apresentam um menor número de mortes. Dos complexos contendo alcinos funcionalizados, as drogas 11 e 14 são as que apresentam uma inibição significativa, entre 40 e 50%, da ordem de 1 μ M.

Será apreciado que a descrição da invenção aqui apresentada, assim como os exemplos descritos, permitem ao homem da técnica realizar a invenção incluindo alterações dentro do seu conhecimento comum, sem no entanto se afastar do escopo da invenção conforme expresso nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSTO CICLOPALADADO, caracterizado pelo fato de ser um composto organometálico que compreende paládio, uma ligação Sigma C - Pd e uma ligação de coordenação $Y \rightarrow Pd$, originando um ciclo orgânico de fórmula correspondente a estruturas abaixo:

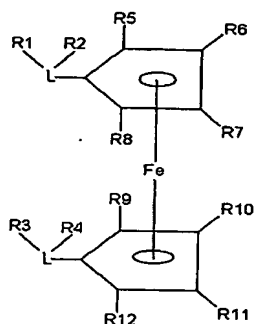


Onde:

- X representa um elemento escolhido dentre seguintes grupos:
 halogênio (Cl, F, Br, I);
 pseudo-halogênio (N_3 , NCO, NCS, SCN); ou
 Acetato (H_3C-COO^-); e
- Y representa um elemento do grupo V ou VI da Tabela Periódica, por exemplo N, P, As, Sb, Bi, O, S, Se, Te,
- C representa um átomo de carbono com hibridização sp^2 ou sp^3 , ligado ao átomo de paládio de forma covalente. O anel contendo C, Y e D pode ser constituído de 3 a 8 átomos
- Entre C e Y, representado por um traço curvo, há uma sucessão de átomos, referida como anel paladado, constituída de 3 a 8 átomos, incluindo o átomo de paládio. De forma típica, sem excluir qualquer outra, tais átomos são escolhidos entre carbono, nitrogênio, oxigênio ou enxofre. Cada um desses átomos componentes do anel pode, por sua vez, ser ligado a outros átomos ou grupamentos, formando estruturas variadas externamente ao anel, lineares ou cíclicas, sem que qualquer limitação específica seja conhecida da Depositante.
- L representa um ligante que é um átomo doador do grupo V da Tabela Periódica (N, P, As, Sb, Bi), dentro de um composto bis-

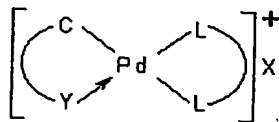
bbp

difenilfosfina-ferroceno conforme detalhado no **Esquema 2** abaixo, sendo a representação esquemática L-L indicativa da presença de dois ligantes L na estrutura do dito composto bis-difenilfosfina-ferroceno, e R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 e R12 representam individualmente os seguintes radicais, que podem se apresentar em qualquer ordem : hidrogênio (H), alquil, aril, dienil, alcóxi, silóxi, hidróxi (OH), amino (-NH₂), imida, halogênio (F, Cl, Br, I), Imina, nitro (-NO₂).

ESQUEMA 2

Ou um de seus sais ou adutos farmacologicamente aceitável.

2. COMPOSTO CICLOPALADADO, caracterizado pelo fato de ser um composto organometálico que compreende paládio, uma ligação Sigma C - Pd e uma ligação de coordenação Y → Pd, originando um ciclo orgânico de fórmula correspondente a estrutura abaixo:



Onde:

- X representa um elemento escolhido dentre seguintes grupos:
halogênio (Cl, F, Br, I);
pseudo-halogênio (N₃, NCO, NCS, SCN); ou
Acetato (H₃C-COO⁻); e
- Y representa um elemento do grupo V ou VI da Tabela Periódica, por exemplo N, P, As, Sb, Bi, O, S, Se, Te,

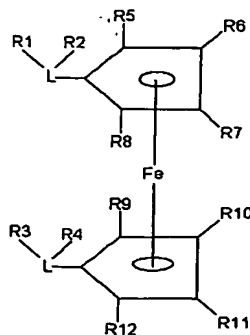
- C representa um átomo de carbono com hibridização sp^2 ou sp^3 , ligado ao átomo de paládio de forma covalente. O anel contendo C, Y e D pode ser constituído de 3 a 8 átomos

hbf

- Entre C e Y, representado por um traço curvo, há uma sucessão de átomos, referida como anel ciclopaladado, constituída de 3 a 8 átomos, incluindo o átomo de paládio. De forma típica, sem excluir qualquer outra, tais átomos são escolhidos entre carbono, nitrogênio, oxigênio ou enxofre. Cada um desses átomos componentes do anel pode, por sua vez, ser ligado a outros átomos ou grupamentos, formando estruturas variadas externamente ao anel, lineares ou cíclicas, sem que qualquer limitação específica seja conhecida da Depositante.

- L representa um ligante que é um átomo doador do grupo V da Tabela Periódica (N, P, As, Sb, Bi), dentro de um composto bis-difenilfosfina-ferroceno conforme detalhado no **Esquema 2** abaixo, sendo a representação esquemática L-L indicativa da presença de dois ligantes L na estrutura do dito composto bis-difenilfosfina-ferroceno, e R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 e R12 representam individualmente os seguintes radicais, que podem se apresentar em qualquer ordem : hidrogênio (H), alquil, aril, dienil, alcóxi, silóxi, hidróxi (OH), amino (-NH₂), imida, halogênio (F, Cl, Br, I), Imina, nitro (-NO₂).

ESQUEMA 2



Ou um de seus sais ou adutos farmacêuticamente aceitável.

3. COMPOSTO CICLOPALADADO, caracterizado pelo fato de ser um composto organometálico que compreende paládio, uma ligação Sigma C - Pd e uma ligação de coordenação $Y \rightarrow Pd$, originando um ciclo orgânico de fórmula correspondente a estruturas abaixo:



Onde:

- X representa um elemento escolhido dentre seguintes grupos:
 halogênio (Cl, F, Br, I);
 pseudo-halogênio (N_3 , NCO, NCS, SCN); ou
 Acetato (H_3C-COO^-); e

- Y representa um elemento do grupo V ou VI da Tabela Periódica, por exemplo N, P, As, Sb, Bi, O, S, Se, Te,
- C representa um átomo de carbono com hibridização sp^2 ou sp^3 , ligado ao átomo de paládio de forma covalente. O anel contendo C, Y e D pode ser constituído de 3 a 8 átomos

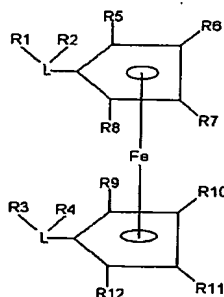
- Entre C e Y, representado por um traço curvo, há uma sucessão de átomos, referida como anel ciclopaladado, constituída de 3 a 8 átomos, incluindo o átomo de paládio. De forma típica, sem excluir qualquer outra, tais átomos são escolhidos entre carbono, nitrogênio, oxigênio ou enxofre. Cada um desses átomos componentes do anel pode, por sua vez, ser ligado a outros átomos ou grupamentos, formando estruturas variadas externamente ao anel, lineares ou cíclicas, sem que qualquer limitação específica seja conhecida da Depositante.

- L representa um ligante que é um átomo doador do grupo V da Tabela Periódica (N, P, As, Sb, Bi), dentro de um composto bis-

69

difenilfosfina-ferroceno, conforme detalhado no **Esquema 2** abaixo, sendo a representação esquemática L-L indicativa da presença de dois ligantes L na estrutura do dito composto bis-difenilfosfina-ferroceno, e R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 e R12 representam individualmente os seguintes radicais, que podem se apresentar em qualquer ordem : hidrogênio (H), alquil, aril, dienil, alcóxi, silóxi, hidróxi (OH), amino (-NH₂), imida, halogênio (F, Cl, Br, I), Imina, nitro (-NO₂).

ESQUEMA 2



Ou um de seus sais ou adutos farmaceuticamente aceitável.

4. COMPOSTO CICLOPALADADO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser selecionado entre o grupo que compreende N,N-dimetil-1-fenetilamina (dmpa) e derivados da N,N-dimetilbenzillamina, dos alcinos piridinil-fenil-etino ou dos 1-fenil-3-N,N-dimetilamino-propino, ou um de seus sais ou adutos farmaceuticamente aceitável.

5. COMPOSTO CICLOPALADADO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de ser N,N-dimetil-1-fenetilamina (dmpa).

6. COMPOSTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de inibir a atividade de proteínas associadas a distúrbios ou doenças.

7. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato da proteína ser uma enzima.

8. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato da enzima compreender as enzimas das famílias cisteino-proteases, serino-peptidases e metalo-proteases.

9. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato das cisteino-proteases compreenderem a Catepsina B, H, J, L, N, S, T e C (dipeptidil-peptidase-I), Enzima Conversora de Interleucina (ICE), proteases neutras ativadas por cálcio, Calpaína I e II, endopeptidases, cisteino-proteases virais, como por exemplo endopeptidase de cardiovírus, endopeptidase de adenovírus e endopeptidase de aftovírus, e proteases essenciais no ciclo de vida de parasitas como por exemplo as proteases das espécies de Plasmodium, Entamoebas, Onchoceras, Leishmanias, Haemonchus, Dictyostelium, Therilerium, Esquistossomas, Tripanossomas.

10. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato da enzima ser a Catepsina B. Cruzaína e Enzima Conversora de Interleucina-1 β .

11. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato das serino-peptidases compreenderem dipeptidil-peptidase IV, acilaminacil-peptidase e oligopeptidase B prolil-oligopeptidase e Catepsina D.

12. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato da enzima ser a Catepsina D.

13. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato das metalo-proteases compreenderem enzima conversora de angiotensina, Colagenases, Estromelisinases, Metalo-protease tipo membrana e Genatinases.

14. COMPOSTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para tratar distúrbios e doenças associados a proteínas e enzimas.

71p

15. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato das doenças compreenderem doenças causadas por degradação de tecidos como artrites, distrofia muscular, invasão tumoral, glomeronefrites, infecções ósseas por parasitas, parasitomias, doenças periodontais e metástase tumoral; doenças cardíacas que envolvam a degradação do fator natriurético atrial; doenças inflamatórias como exemplo bronquites, artrites reumatóides, osteoporose, pancreatite aguda e progressões do câncer; distúrbios como a amnésia, controle da depressão e pressão sangüínea; diabetes, tripanossomias, doença de Chagas, distúrbios alimentares, bulimia nervosa e anorexia; alcoolismo, doenças relacionadas a produção de citocinas e receptores de citocinas tais como, interleucina-6 (IL-6), fator alfa de necrose tumoral (TNF-alpha), interferon-gama (INFN-gamma), receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA), IL-10, e fator estimulante de crescimento de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), stress psicológico; combate das infecções causadas pelo vírus HIV (Aids); doenças inflamatórias do Sistema Nervoso Central que acarretam degradação da Mielina, incluindo a Esclerose Múltipla e Encefalomielite autoimune; tumores cancerígenos, doenças autoimunes, tumores compreendendo de mama, medulares, adenomas, tireóide, melanoma, gástrico, intestinal, esôfago, e tireoideanos, neuroblastomas.

16. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 15 caracterizado pelo fato da doença ser tumores ascíticos ou sólidos, particularmente tumores de mama, medulares, adenomas, tireóide, melanoma, gástrico, intestinal, esôfago, e tireoideanos, neuroblastomas.

17. COMPOSTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de impedir células jovens da medula óssea de entrarem em divisão celular (fase S).

18. COMPOSTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6,

caracterizado pelo fato de ser antiangiogênico.

19. COMPOSTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de ser antimetastático.

20. COMPOSTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de ser útil no complemento de tratamentos a base de radioterapia.

21. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de interagir com o DNA.

22. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser imunomodulador.

23. COMPOSIÇÃO, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos um composto de acordo com as reivindicações de 1 a 22, ou um de seus sais ou adutos farmacêuticamente aceitável.

24. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de compreender cerca de 0,001 a 99%, em peso total da composição, do composto, ou um de seus sais ou adutos, e pelo menos um veículo farmacêuticamente aceitável.

25. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de compreender cerca de 0,01 a 70%, em peso total da composição, do composto, ou um de seus sais ou adutos, e pelo menos um veículo farmacêuticamente aceitável.

26. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de compreender cerca de 0,1 a 40%, em peso total da composição, do composto, ou um de seus sais ou adutos, e pelo menos um veículo farmacêuticamente aceitável.

27. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente um solvente.

28. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 27,

caracterizada pelo fato do solvente ser o DMSO.

29. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de se apresentar nas formas de dosagem sólidas, tais como cápsulas, tabletes e pós, ou em formas de dosagem líquidas, tais como elixires, xaropes, emulsões, soluções, suspensões, misturas, infusões.

30. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato das formulações serem de liberação programada ou prolongada.

31. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de sua administração ser dar por meios que compreendem oral, subcutâneo, intravenoso, intranasal, transdermal, intraperitoneal, localizada, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, retal, intraocular ou sublingual, sistemas de fornecimento de lipossomas.

32. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de sua administração ser dar por meio injetável, particularmente intraperitoneal.

33. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de compreender particularmente água, solução salina e/ou tampão fosfato pH 7,4 e de 0,1 a 30% de DMSO, mais particularmente de 1 a 10% em peso da composição, e agentes estabilizantes ou conservantes se necessário.

34. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de compreender de cerca de 0,0001 a 250 mg, mais particularmente de cerca de 0,1 a 100 mg de pelo menos um composto de acordo com as reivindicações de 1 a 22, ou um de seus sais ou adutos farmaceuticamente aceitável.

35. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de inibir a atividade de proteínas associadas a

distúrbios ou doenças.

36. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato da proteína ser uma enzima.

75p

5 37. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 36 caracterizada pelo fato da enzima compreender as enzimas das famílias cisteino-proteases, serino-peptidases e metalo-proteases.

10 38. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 37 caracterizada pelo fato das cisteino-proteases compreenderem a Catepsina B, H, J, L, N, S, T e C (dipeptidil-peptidase-I), Enzima Conversora de Interleucina (ICE), proteases neutras ativadas por cálcio, Calpaína I e II, endopeptidases, cisteino-proteases virais, como por exemplo endopeptidase de cardiovírus, endopeptidase de adenovírus e endopeptidase de aftovírus, e proteases essenciais no ciclo de vida de parasitas como por exemplo as proteases das espécies de Plasmodium, Entamoebas, Onchoceras, Leishmanias, 15 Haemonchus, Dictyostelium, Therilerium, Esquistossomas, Tripanossomas.

39. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato da enzima ser Catepsina B, Cruzaina e Enzima Conversora de Interleucina-1 β .

20 40. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato das serino-peptidases compreenderem dipeptidil-peptidase IV, acilaminacil-peptidase e oligopeptidase B e prolil-oligopeptidase.

41 COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato da enzima ser a Catepsina D.

25 42. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato das metalo-proteases compreenderem enzima conversora de angiotensina, Colagenases, Estromelisinases, Metalo-protease tipo membrana e Genatinases.

43. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 37,

76b

46. COMPOSIÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 23 a 37, caracterizada pelo fato de impedir células jovens da medula óssea de entrarem em divisão celular (fase S).

47. COMPOSIÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 23 a 37, caracterizada pelo fato de ser antiangiogênica.

48. COMPOSIÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 23 a 37, caracterizada pelo fato de ser antimetastática.

5 49. COMPOSIÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 23 a 37, caracterizada pelo fato de ser útil no complemento de tratamentos a base de radioterapia.

50. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de interagir com o DNA.

10 51. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de ser imunomoduladora.

52. COMPOSIÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 23 a 37, caracterizada pelo fato de compreender o volume total de sangue do paciente e agente ativo em concentração de cerca de 0,01 a 200 μ M, particularmente 0,1 a 50 μ M, mais particularmente de 10 a 25 μ M.

53. UNIDADE DE DOSAGEM, caracterizada por compreender pelo menos um composto de acordo com uma das reivindicações 1 a 22, ou um de seus sais ou adutos farmacêuticamente aceitável.

54. UNIDADE DE DOSAGEM, caracterizada por compreender 20 pelo menos uma composição de acordo com uma das reivindicações 23 a 52.

55. UNIDADE DE DOSAGEM, de acordo com a reivindicação 53 ou 54, caracterizada pelo fato da quantidade do composto ou composição, ser suficiente para levar a concentração de cerca de 0,01 a 200 μ M, particularmente 0,1 a 50 μ M, mais particularmente de 10 a 25 μ M do ingrediente 25 ativo no volume total de sangue do paciente.

56. UNIDADE DE DOSAGEM, de acordo com as reivindicações 53 a 55, caracterizada pelo fato de compreender formas sólidas e líquidas.

57. UNIDADE DE DOSAGEM, de acordo com a reivindicação 56, caracterizada pelo fato de compreender formas de dosagem como cápsulas, tabletes e pós, ou elixires, xaropes, emulsões, soluções, suspensões, misturas, infusões.

5 58. UNIDADE DE DOSAGEM, de acordo com a reivindicação 53 caracterizada pelo fato das formulações serem de liberação programada ou prolongada.

59. UNIDADE DE DOSAGEM, de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de compreenderem pelo menos uma camada de revestimento.

60. MÉTODO PARA INIBIR A ATIVIDADE DE PROTEÍNAS associadas a distúrbios ou doenças, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade eficaz de um composto de acordo com uma das reivindicações 1 a 22 ou uma composição de acordo com uma das reivindicações de 23 a 52 ou unidade de dosagem de acordo com uma das reivindicações de 53 a 59.

61. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato da proteína ser uma enzima.

62. MÉTODO DE TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS E DOENÇAS, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade eficaz de um composto de acordo com uma das reivindicações 1 a 22 ou uma composição de acordo com uma das reivindicações de 23 a 52 ou unidade de dosagem de acordo com uma das reivindicações de 53 a 59.

63. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de ser para distúrbios e doenças associados à atividade protéica ou enzimática.

64. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 60 ou 62, caracterizado pelo fato da enzima compreender as enzimas das famílias

cisteino-proteases, serino-peptidases e metalo-proteases.

65. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato das cisteino-proteases compreenderem a Catepsina B, H, J, L, N, S, T e C (dipeptidil-peptidase-I), Enzima Conversora de Interleucina (ICE), proteases neutras ativadas por cálcio, Calpaína I e II, endopeptidases, cisteíno-proteases virais, como por exemplo endopeptidase de cardiovírus, endopeptidase de adenovírus e endopeptidase de aftovírus, e proteases essenciais no ciclo de vida de parasitas como por exemplo as proteases das espécies de Plasmodium, Entamoebas, Onchoceras, Leishmanias, Haemonchus, Dictyostelium, Therilerium, Esquistossomas, Tripanossomas.

66. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato da enzima ser a Catepsina B. Cruzaína e Enzima Conversora de Interleucina-1 β .

67. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 64 caracterizado pelo fato das serino-peptidases compreenderem dipeptidil-peptidase IV, acilaminacil-peptidase e oligopeptidase B e prolil-oligopeptidase.

68. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato da enzima ser a Catepsina D.

69. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato das metalo-proteases compreenderem enzima conversora de angiotensina, Colagenases, Estromelisinases, Metalo-protease tipo membrana e Genatinases.

70. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato das doenças compreenderem doenças causadas por degradação de tecidos como artrites, distrofia muscular, invasão tumoral, glomeronefrites, infecções ósseas por parasitas, parasitomas, doenças periodontais e metástase tumoral; doenças cardíacas que envolvam a degradação do fator natriurético atrial; doenças inflamatórias como exemplo bronquites, artrites

79/

reumatóides, osteoporose, pancreatite aguda e progressões do câncer; distúrbios como a amnésia, controle da depressão e pressão sangüínea; diabetes, tripanossomias, doença de Chagas, distúrbios alimentares, bulimia nervosa e anorexia; alcoolismo, doenças relacionadas a produção de citocinas e receptores de citocinas tais como, interleucina-6 (IL-6), fator alfa de necrose tumoral (TNF-alpha), interferon-gama (INFN-gamma), receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA), IL-10, e fator estimulante de crescimento de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), stress psicológico; combate das infecções causadas pelo vírus HIV (Aids); doenças inflamatórias do Sistema Nervoso Central que acarretam degradação da Mielina, incluindo a Esclerose Múltipla e Encefalomielite autoimune; tumores cancerígenos, doenças autoimunes, tumores compreendendo de mama, medulares, adenomas, tireóide, melanoma, gástrico, intestinal, esôfago, e tireoideanos, neuroblastomas.

71. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato da doença ser tumores ascíticos ou sólidos, particularmente tumores de mama, medulares, adenomas, tireóide, melanoma, gástrico, intestinal, esôfago, e tireoideanos, neuroblastomas.

72. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 60 a 63, caracterizado pelo fato de impedir células jovens da medula óssea de entrarem em divisão celular (fase S).

73. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 60 a 63, caracterizado pelo fato de ser antiangiogênico.

74. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 60 a 63, caracterizado pelo fato de ser antimetastático.

75. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 60 a 63, caracterizado pelo fato de ser útil no complemento de tratamentos a base de radioterapia.

76. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 60 a 63,

80/

caracterizado pelo fato de compreender a administração de ingrediente ativo de cerca de 0,0001 a cerca de 500 miligramas por quilograma de peso do corpo, sendo a dose particular de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e mais particularmente de 0,0001 a cerca de 30 mg/kg.

5 77. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 60 a 63, caracterizado pelo fato de compreender a administração de ingrediente ativo suficiente para suficiente para levar a concentração de cerca de 0,01 a 200µM, particularmente 0,1 a 50µM, mais particularmente de 10 a 25µM do ingrediente ativo no volume total de sangue do paciente.

10 78. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 60 a 63, caracterizado pelo fato da administração se dar por meio de unidades de dosagem de acordo com as reivindicações 53 a 59.

15 79. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 60 a 63, caracterizado pelo fato da administração ser contínua, não contínua ou cíclica.

20 80. MÉTODO DE MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade eficaz de um composto de acordo com uma das reivindicações 1 a 22 ou uma composição de acordo com uma das reivindicações de 23 a 52 ou unidade de dosagem de acordo com uma das reivindicações de 53 a 59.

 81. USO DO COMPOSTO de acordo com uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição.

25 82. USO, de acordo com a reivindicação 81, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para inibir a atividade de proteínas e enzimas.

 83. USO DE UMA COMPOSIÇÃO de acordo com uma das reivindicações 23 a 52, caracterizado pelo fato de ser na preparação de

medicamento para inibir a atividade de proteínas e enzimas.

84 USO, de acordo com uma das reivindicações 81 a 83, caracterizado pelo fato da enzima compreender as enzimas das famílias cisteino-proteases, serino-peptidases e metalo-proteases.



5 85. USO, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato das enzimas compreenderem a Catepsina B, H, J, L, N, S, T e C (dipeptidil-peptidase-I), Enzima Conversora de Interleucina (ICE), proteases neutras ativadas por cálcio, Calpaína I e II, endopeptidases, cisteíno-proteases virais, como por exemplo endopeptidase de cardiovírus, endopeptidase de
10 adenovírus e endopeptidase de aftovírus, e proteases essenciais no ciclo de vida de parasitas como por exemplo as proteases das espécies de Plasmodium, Entamoebas, Onchoceras, Leishmanias, Haemonchus, Dictyostelium, Therilerium, Esquistossomas, Tripanossomas; Catepsina D ou ser a Encefalinase; dipeptidil-peptidase IV, acilaminacil-peptidase e
15 oligopeptidase B e prolil-oligopeptidase; enzima conversora de angiotensina, Colagenases, Estromelisinases, Metalo-protease tipo membrana e Genatinases.

20 86. USO, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato das doenças compreenderem doenças causadas por degradação de tecidos como artrites, distrofia muscular, invasão tumoral, glomeronefrites, infecções ósseas por parasitas, parasitomias, doenças periodontais e
25 metástase tumoral; doenças cardíacas que envolvam a degradação do fator natriurético atrial; doenças inflamatórias como exemplo bronquites, artrites reumatóides; osteoporose, pancreatite aguda e progressões do câncer; distúrbios como a amnésia, controle da depressão e pressão sanguínea; diabetes, tripanossomias, doença de Chagas, distúrbios alimentares, bulimia nervosa e anorexia; alcoolismo, doenças relacionadas a produção de citocinas e receptores de citocinas tais como, interleucina-6 (IL-6), fator alfa de necrose tumoral (TNF-alpha), interferon-gama (INFN-gamma), receptor antagonista de

IL-1 (IL-1RA), IL-10, e fator estimulante de crescimento de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), stress psicológico; combate das infecções causadas pelo vírus HIV (Aids); doenças inflamatórias do Sistema Nervoso Central que acarretam degradação da Mielina, incluindo a Esclerose Múltipla e Encefalomielite auto-imune; tumores cancerígenos, doenças autoimunes, tumores compreendendo ascísticos ou sólidos, tumores de mama, medulares, adenomas, tireóide, melanoma, gástrico, intestinal, esôfago, e tireoideanos, neuroblastomas.

83/

87. USO, de acordo com a reivindicação 81 ou 83, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para tratar distúrbios e doenças associados à atividade protéica ou enzimática.

88. USO, de acordo com a reivindicação 81 ou 83, caracterizado pelo fato de impedir células jovens da medula óssea de entrarem em divisão celular (fase S).

89. USO, de acordo com a reivindicação 81 ou 83, caracterizado pelo fato de ser antiangiogênico.

90. USO, de acordo com a reivindicação 81 ou 83, caracterizado pelo fato de ser antimetastático.

91. USO, de acordo com a reivindicação 81 ou 83, caracterizado pelo fato de ser no complemento de tratamentos a base de radioterapia.

92. USO, de acordo com a reivindicação 81 ou 83, caracterizado pelo fato de interagir com o DNA.

93. USO, de acordo com a reivindicação 81 ou 83, caracterizada pelo fato de ser imunomoduladora.

824

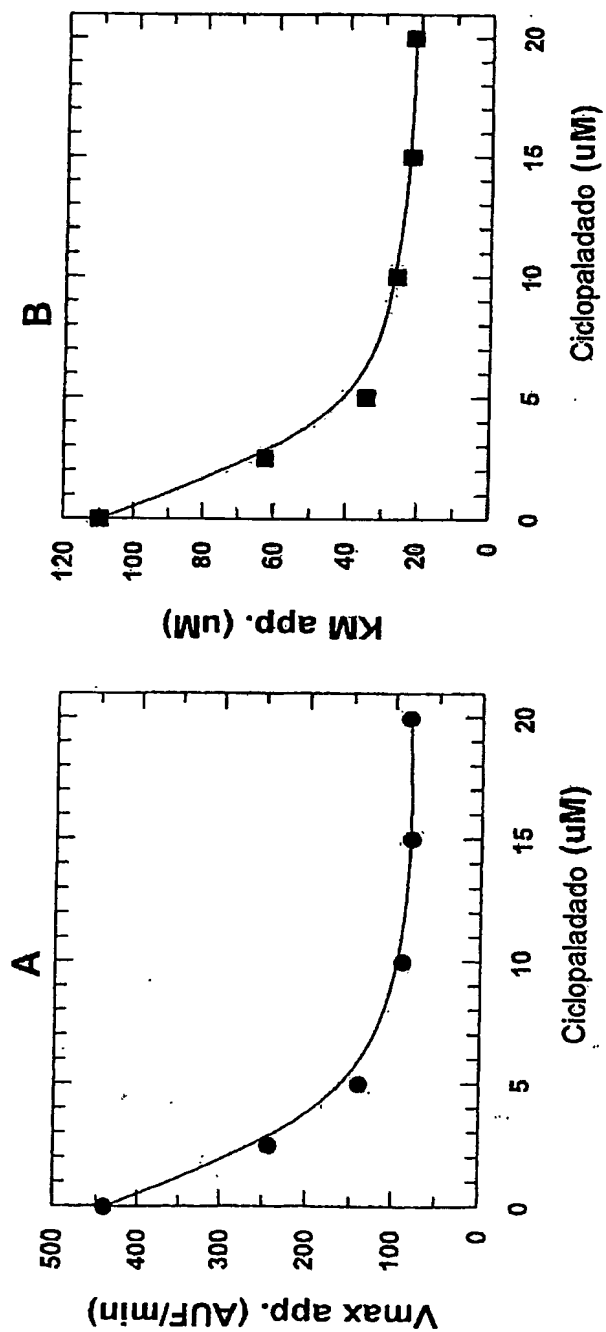


FIGURA 1

85b

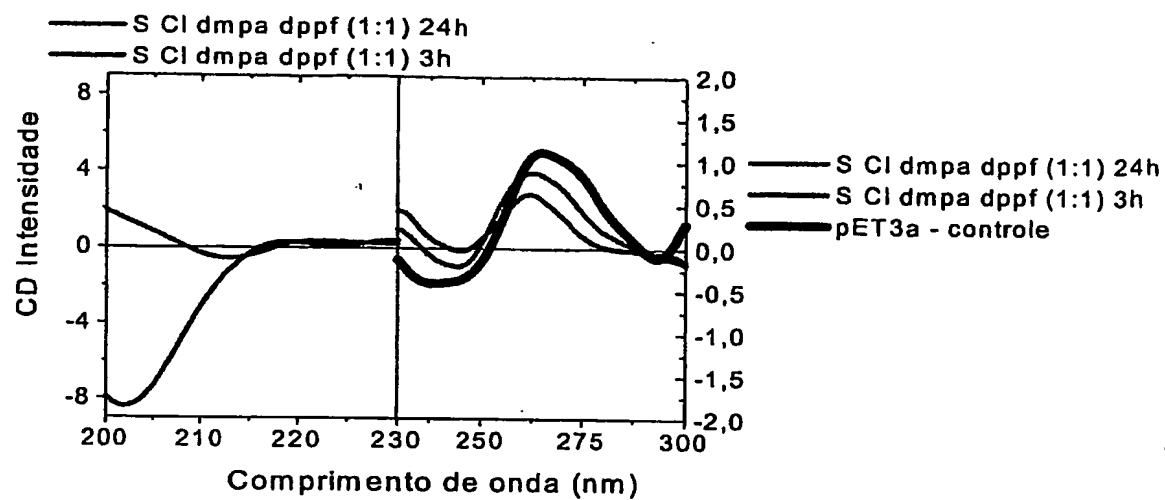


FIGURA 2A

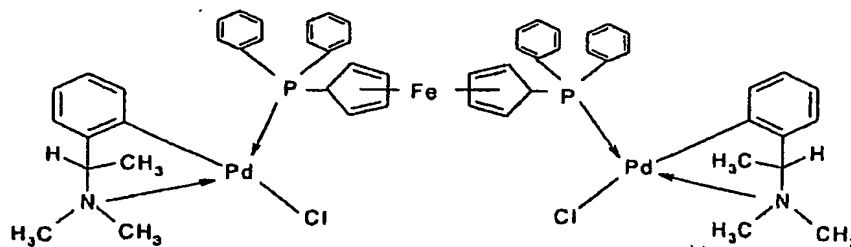


FIGURA 2B

3/11

86p

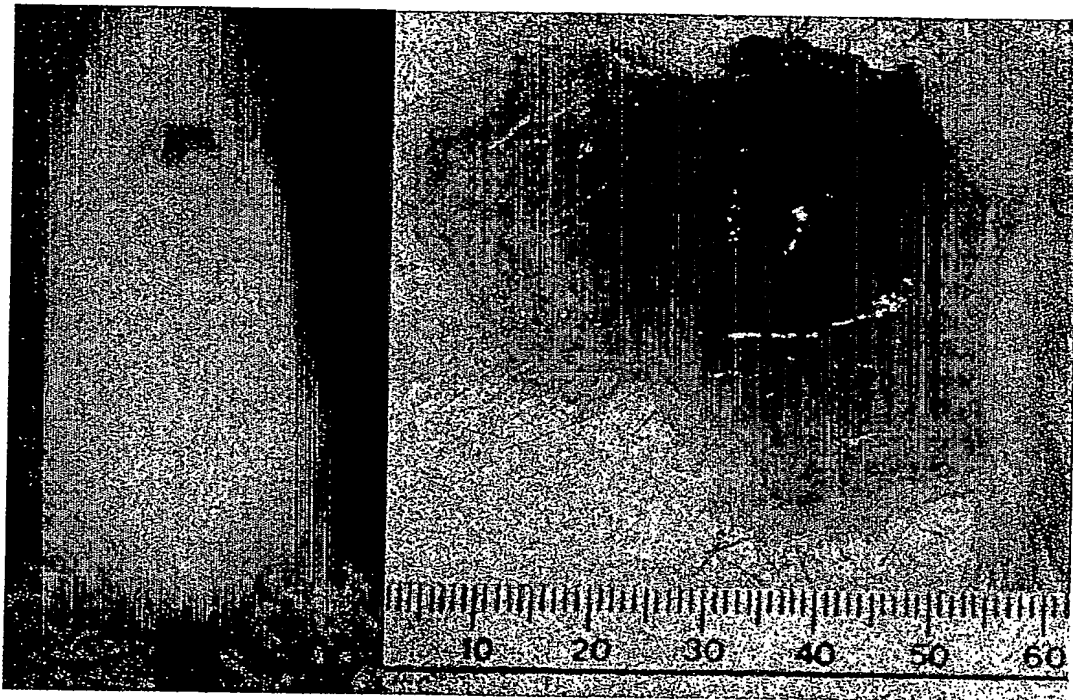


FIGURA 3

87p

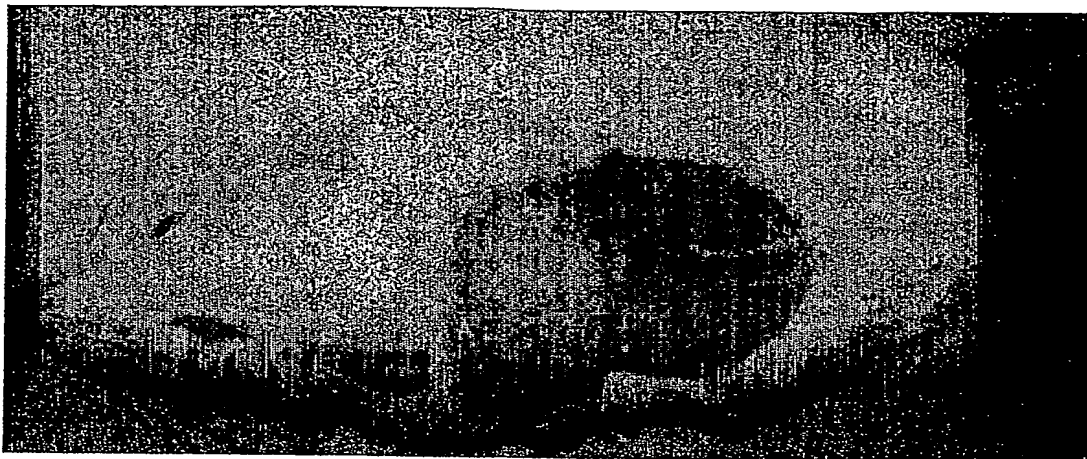


FIGURA 4



FIGURA 5

5/11

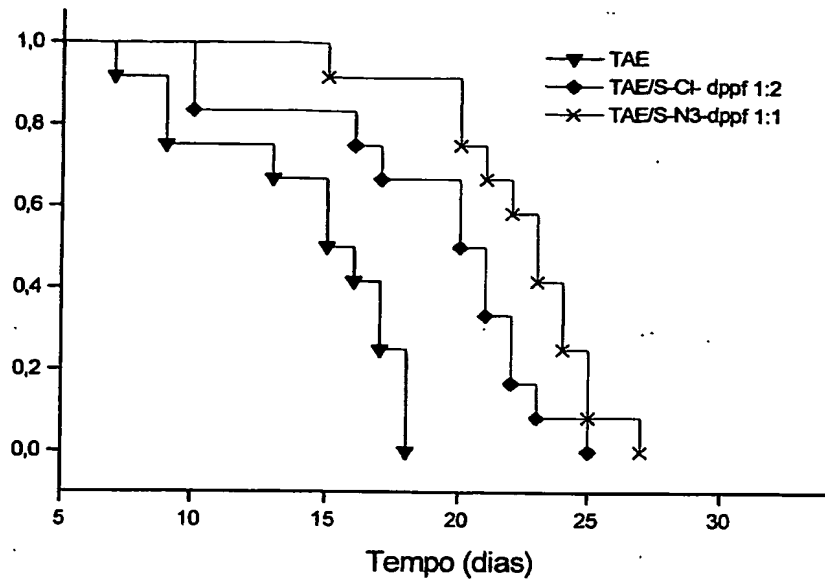


FIGURA 6

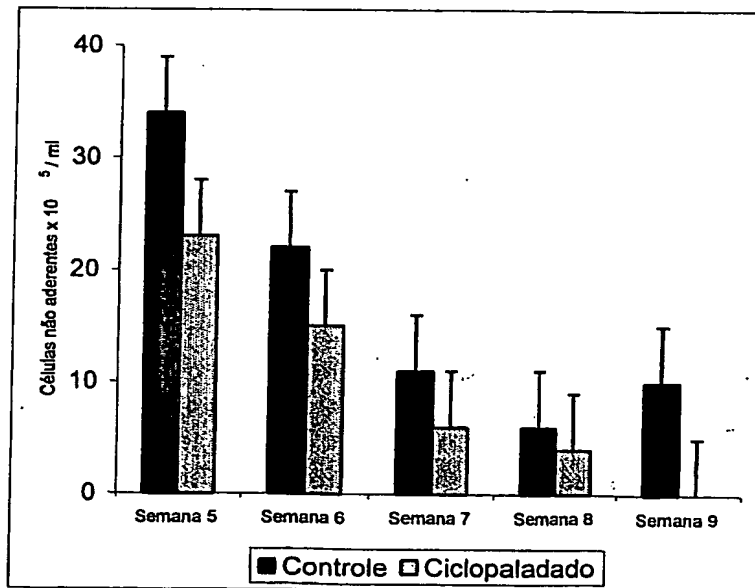


FIGURA 7

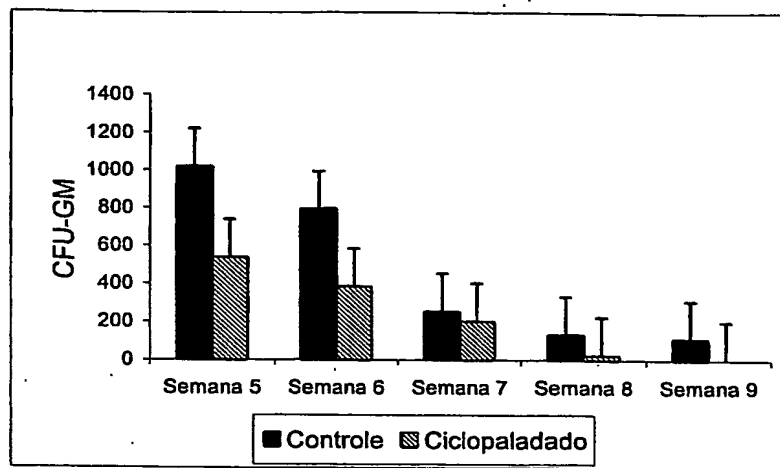


FIGURA 8

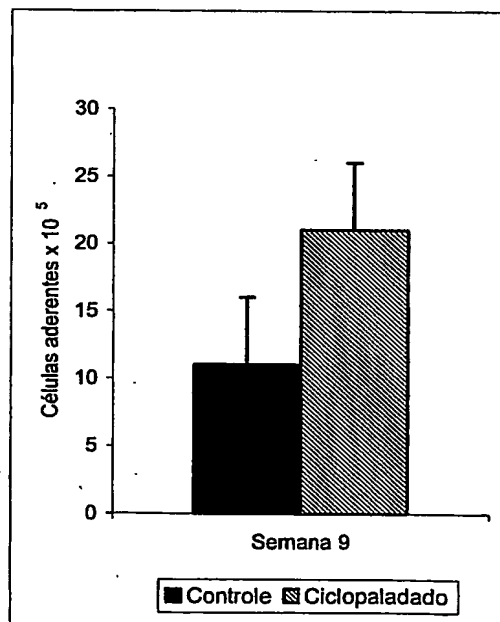


FIGURA 9

90h

Percentagem de sobrevivência celular de células HL60
incubadas por 72 h com vários compostos ciclopáladados.
Avaliação realizada através do método de MTT

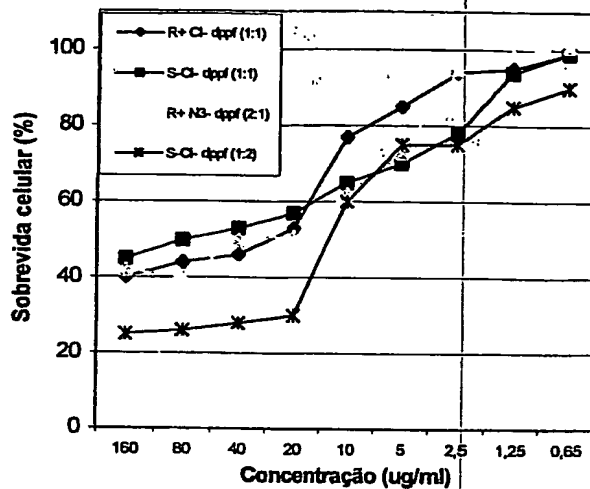


FIGURA 10

Percentagem de sobrevivência celular de células K-562
incubadas por 72 h com vários compostos ciclopáladados.
Avaliação realizada através do método de MTT.

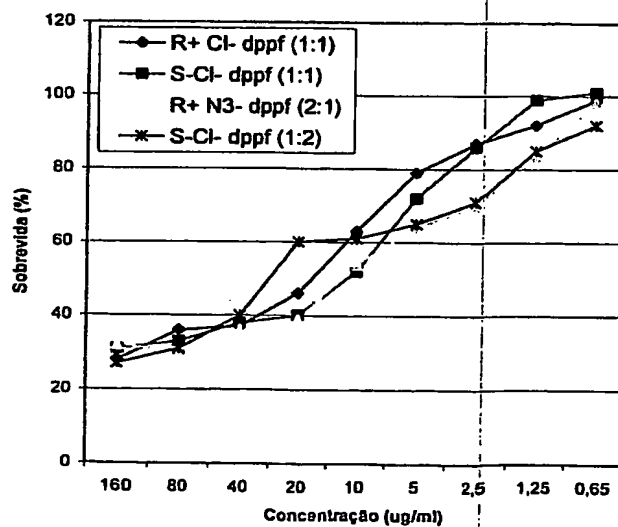


FIGURA 11

8/11

91p

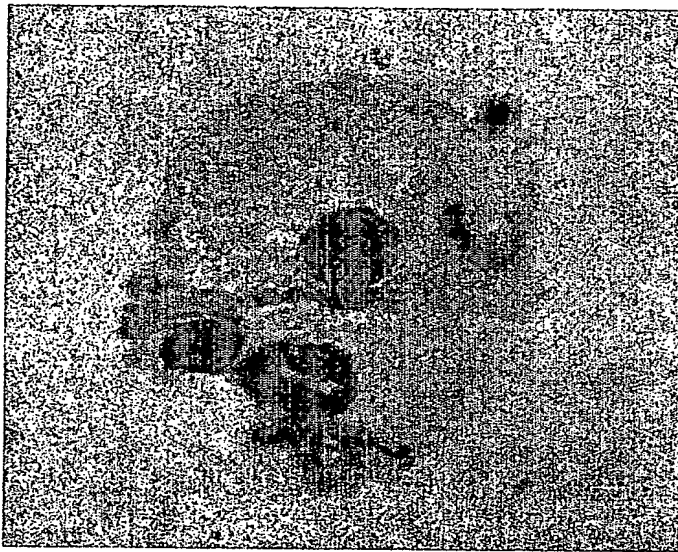


FIGURA 12

9/11

92b

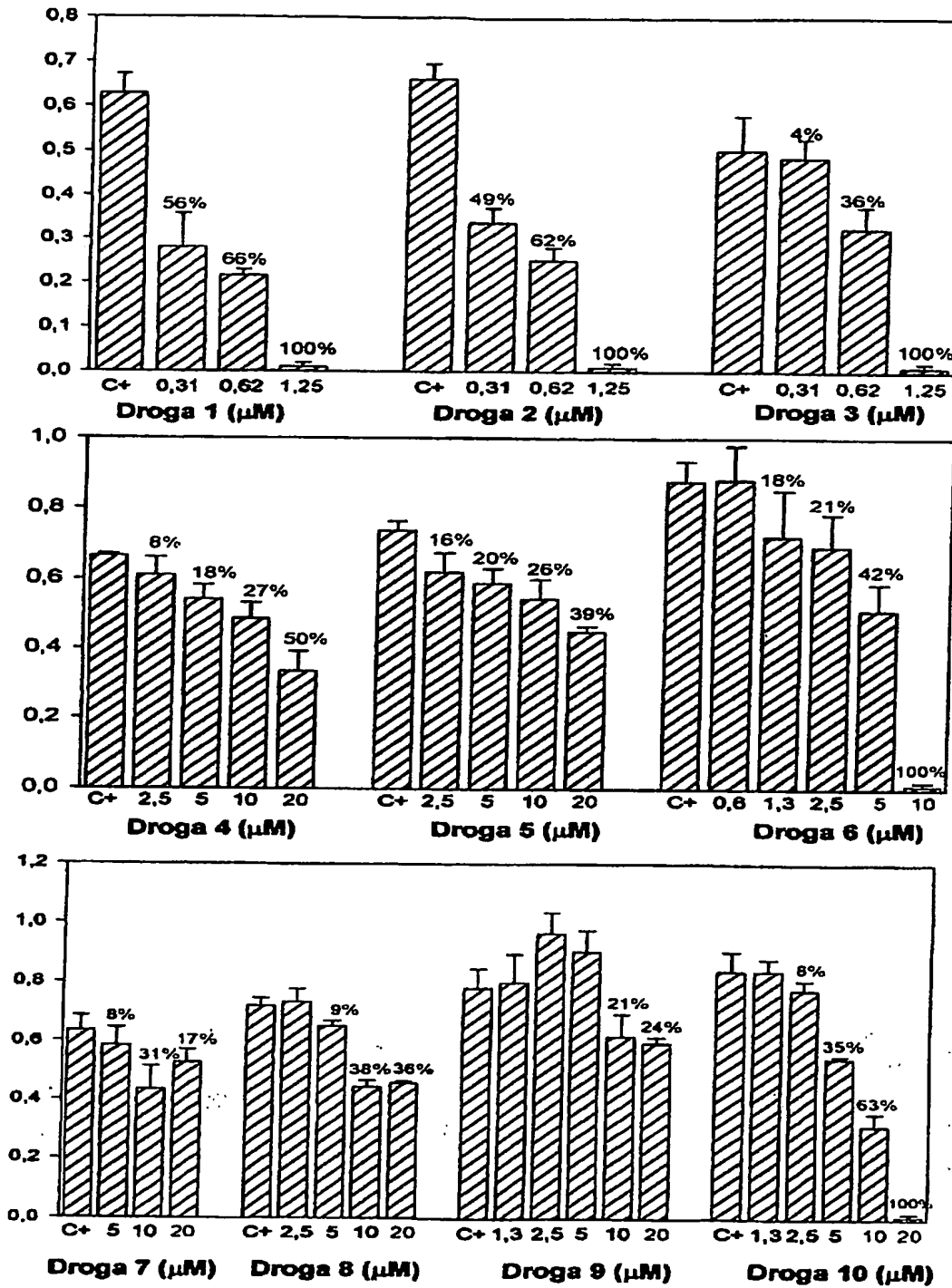


FIGURA 13

93/

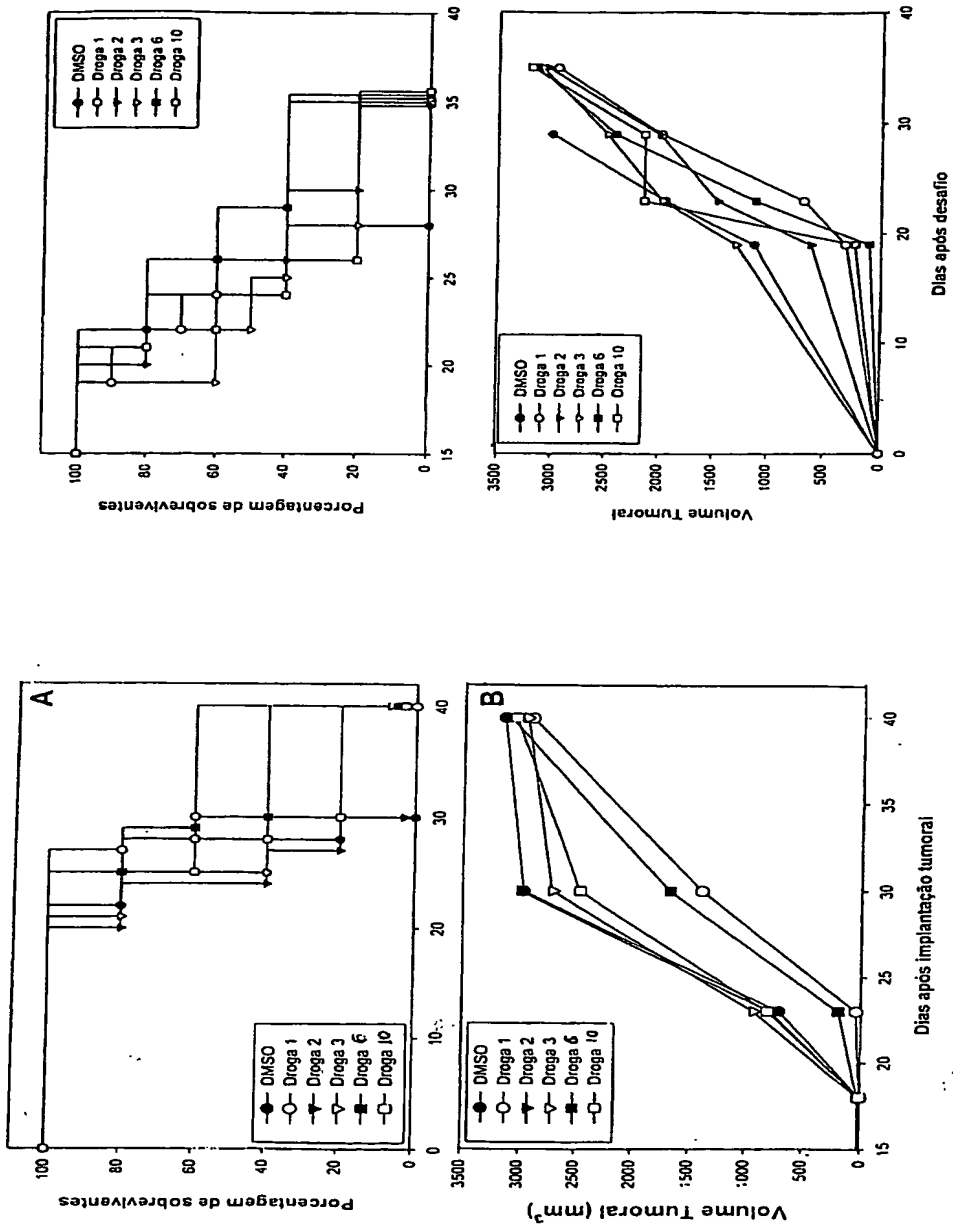


FIGURA 15

FIGURA 14

94p

**MODIFICAÇÕES DA DROGA 1
ENSAIO IN VITRO
B16F10-NEX2**

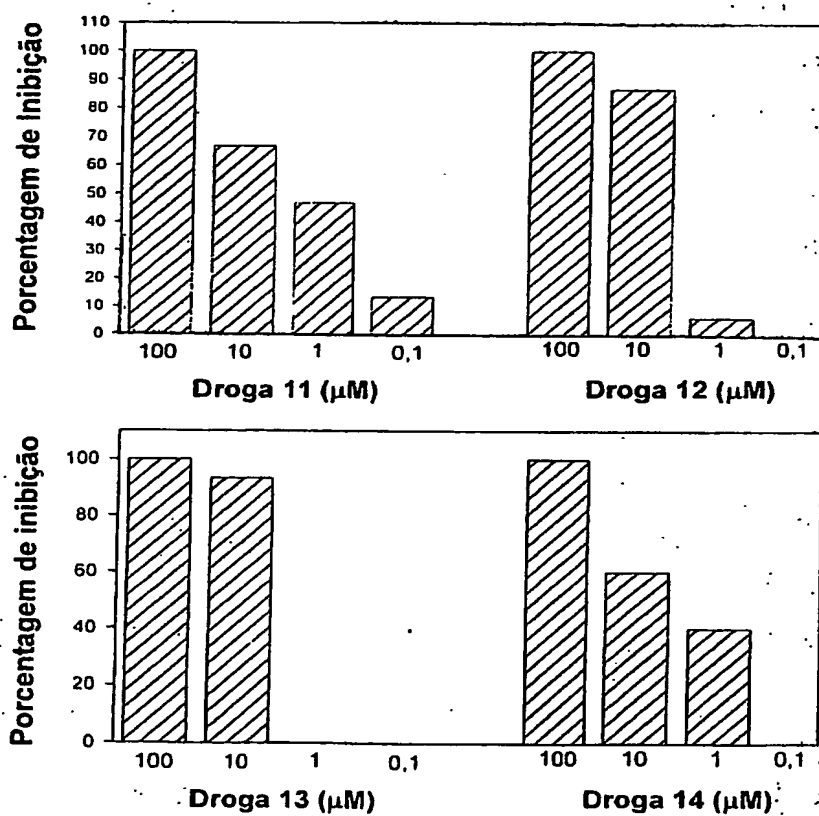


FIGURA 16

RESUMO

**"COMPOSTO CICLOPALADADO, COMPOSIÇÃO E UNIDADE DE
DOSAGEM, SEUS USOS, MÉTODO PARA INIBIR A ATIVIDADE DE
PROTEÍNAS E ENZIMAS E MÉTODO DE TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS
5 OU DOENÇAS ASSOCIADAS ÀS MESMAS E MÉTODO DE MODULAÇÃO
DO SISTEMA IMUNOLÓGICO"**

95h

A presente invenção trata de compostos ciclopaladados contendo
ligantes bis-difenilfosfina-ferroceno e seus análogos como ativos inibidores de
peptídeos e enzimas compreendendo as famílias de serino-peptidases,
10 cisteíno-proteases, metalo-proteases, endopeptidases, muitas das quais
essenciais no mecanismo de desenvolvimento e metástase de tumores
malignos. Atuando sobre essas enzimas e participando de intercalações com
moléculas de DNA, esses compostos modulam o sistema imunológico.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.